



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIBLIOTECAS
SUBTRACTIVAS DE ADN COMPLEMENTARIO DE PLANTAS DE
CHILE (*Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim) INFECTADAS CON
EL GEMINIVIRUS HUASTECO DE CHILE”**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA

Q.F.B. YADIRA RIVERA HERRERA

Santiago de Querétaro, Qro., Enero, 2004

No Adq H68768

Clas TS

581.15

R621c



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

“Elaboración y caracterización de bibliotecas sustractivas de ADN complementario de plantas de Chile (*Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim) infectadas con el Geminivirus Huasteco de Chile”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

Q.F.B. Yadira Rivera Herrera

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

SINODALES

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco

Secretario

Dr. Lorenzo Guevara Olvera

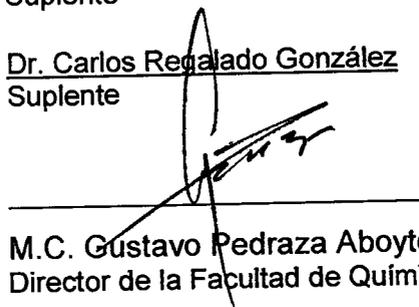
Vocal

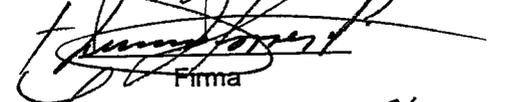
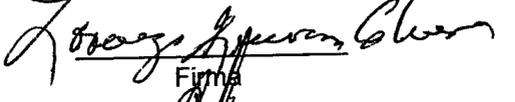
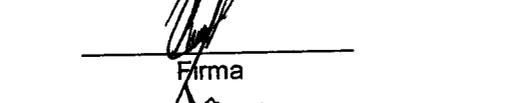
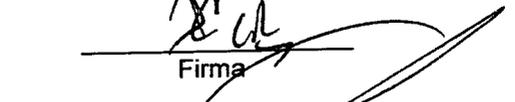
Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Suplente

Dr. Carlos Regalado González

Suplente


M.C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad de Química


Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya, bajo el asesoramiento del Dr. Ramón Gerardo Guevara González.

RESUMEN.

Se evaluaron por el método de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR (SSH), plantas de chile *Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim infectadas con el geminivirus huasteco del chile (PHV), con la finalidad de analizar la expresión de genes diferenciales como respuesta a la infección por PHV. Cuando se observaron los primeros síntomas característicos de infección por PHV (15 días posinoculación), además de detectar el virus mediante PCR, se realizó la extracción de ARN; posteriormente se sintetizaron los ADN's complementarios a partir de los ARNm, para lo cual se uso el paquete SMART. Para realizar el análisis diferencial se hizo utilidad de la SSH en combinación con arreglos de ADNc.

Se construyeron 2 bibliotecas sustractivas, la primera contiene 61 clonas con inserto y corresponde a la biblioteca donde se encuentran los genes que se encienden por presencia del virus en la planta; la segunda biblioteca sustractiva, consta de 48 clonas con inserto, en esta biblioteca se encuentran genes que se apagan por presencia del virus en la planta.

De los arreglos de ADNc, 44 secuencias fueron identificadas como diferenciales, de las cuales 9 clonas se mandaron a secuenciar y se realizo un análisis de dichas secuencias en el banco de genes de la NCBI (National Center of Biotechnology Information). Las secuencias analizadas tienen posibles funciones involucradas en ciclo celular, transducción de señales y repuesta de defensa a patógenos.

(Palabras claves: Geminivirus, Hibridación sustractiva, microarreglos)

SUMMARY

Capsicum annuum cv. Sonora Anaheim plants were infected with Pepper Huasteco Geminivirus (PHV) and evaluated by the Subtractive Suppression Hybridization method (SSH) to analyze the differential expression of genes in this plant-pathogen interaction. After typical symptoms of PHV infection were observed on these plants (15 days postinoculation), PCR detection of the virus was carried out. Then, RNA extraction of these plants was accomplished and cDNA was synthesized from. To carry out the differential gene expression study, a subtractive cDNA library was constructed using suppression by PCR (SSH).

Two subtractive libraries were elaborated; the first one contained 61 clones and these corresponds to the genes that "turn on" with the virus presence in the plant; the second one contained 48 clones and these corresponds to the genes that "turn off" with the virus presence in the plant.

From cDNA arrays on nylon membranes 44 differentially expressed sequences were identified and 9 clones were chosen for further characterization. These 9 clones were sequenced, and analyzed in NCBI algorithms. These analysis showed that genes probably involved in cell cycle, signal transduction and protective proteins, were induced by PHV infection of *C. annuum* plants evaluated in this work.

(Key words: Geminivirus, Subtractive Hybridization, Microarrays)

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me otorgó para la realización de esta Maestría.

Un agradecimiento muy especial al **Dr. Ramón G. Guevara González** por haberme brindado su confianza y aceptado como integrante de su equipo de trabajo, gracias por su valioso asesoramiento y por permitirme conocer a la excelente persona.

A mis sinodales, Dr. Irineo Torres Pacheco, Dr. Lorenzo Guevara Olvera, Dra. Rosalía Reynoso Camacho y Dr. Carlos Regalado González, gracias por haber intervenido aportando su valioso conocimiento y experiencia.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular, José Luis, Humberto, Maribel, Faby, Fer, Carlitos, Chayo, Kari, por su apoyo y afecto incondicional.

DEDICATORIAS

Este trabajo esta dedicado especialmente a mis padres Juan Rivera Hernández y Eloína Herrera de Rivera, lo primero que recibí de ustedes fue la vida, desde entonces siempre he contado con su amor, confianza, protección, educación, consejos.... Aun en la distancia siempre están en mi ser. Gracias hoy y siempre.

A mi hermana Erika Rivera Herrera eres un regalo que dios me envió. En ti veo amor, inteligencia, fortaleza, agallas en todo lo que emprendes, para mi eres un ejemplo a seguir. Gracias por tu cariño y apoyo que siempre he encontrado.

A la memoria de mi Abuelita Jose, quien se nos adelanto en el camino.

Alfredo, la vida y el destino me han permitido conocerte e integrarte a mi vida y hoy tengo la dicha de compartir esta fase tan importante contigo.

A mis abuelitos Luis, Agrícola y Gelacio quienes rezan por mi bienestar.

A mis tíos, Luis, Víctor, Ángel, Guille, Yofiz, Mary, Estela, Chata, Jaime, Gelacio, Pepe, Pancha y Petra, les agradezco enormemente su cariño y apoyo.

A mis primos, Miguel, Ale, Ulises, Omar, Beto, Alberto, Arturo, Víctor, Edher, por todos los momentos agradables compartidos.

A mis sobrinos, Michel y Miguelito

A mis amigos y compañeros, Lupita, Claudia, Esmeralda, Haydé, Rocío, Javier, Maribel, Juanito, Luis, Estefita, Víctor, por todas las experiencias que tuvimos como alumnos y por sus muestras de afecto y apoyo brindados.

ÍNDICE

Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Objetivo general	iii
Objetivos específicos	iv
Apéndice	v
I. INTRODUCCION	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Origen e importancia del chile	3
2.2 Principales enfermedades en el cultivo de chile	6
2.3 Geminivirus	8
2.4 El virus huasteco del chile	10
2.5 Patogenicidad en plantas por geminivirus	12
2.6 Papel que juegan los genes que codifican para proteínas virales en infección en plantas	15
2.7 Resistencia Sistémica Adquirida en Plantas	18
2.8 Genes de resistencia en plantas	19
2.9 Estudios de la expresión diferencial de genes	22
III. METODOLOGIA	
A. Materiales	26
3.1 Material vegetal	26
3.2 Plásmidos y cepas bacterianas	26
B. Métodos	29
3.1 Biobalística	29
3.2 Extracción de ADN genómico	32
3.3 Detección de PHV	33
3.4 Extracción de ARN. Método RNeasy de QIAGEN	35
3.5 Síntesis de ADNc. Método SMART de CLONTECH	37
3.5.1 Síntesis de primera cadena de ADNc	37

3.5.1 Síntesis de primera cadena de ADNc	37
3.5.2 Amplificación de ADNc por PCR	40
3.5.3 Purificación de ADNc por columna cromatográfica	43
3.5.4 Digestion con <i>Rsa</i> I	45
3.6. Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR. Método PCR-Select de CLONTECH	45
3.6.1 Ligación de adaptadores	48
3.6.2 Primera hibridación	51
3.6.3 Segunda hibridación	51
3.6.4 Amplificación por PCR	52
3.7 Extracción de ADN de geles de agarosa. Método QIAEX II	55
3.8 Ligación y Transformación de los ADNc expresados diferencialmente en el vector TOPO PCR 2.1 de Invitrogen	56
3.8.1 Ligación	56
3.8.2 Transformación	57
3.9 Extracciones plasmídicas. Método QIAprep	57
3.10 Construcción de arreglos de ADNc	59
3.11. Etiquetado de sondas y amplificación de la señal. Método ECF de amersham pharmacia biotech	59
3.11.1 Monitoreo de la sonda marcada	62
3.11.2 Hibridación y lavados de astringencia	63
3.11.3 Bloqueo, incubación de anticuerpo y lavados	63
3.11.4 Generación y detección de la señal	64
 IV. RESULTADOS	 65
4.1 Biobalística	65
4.2 Extracción de ADN genómico	65
4.3 Detección de PHV	67
4.4 Extracción de ARN	69
4.5 Síntesis de ADNc	69
4.6 Hibridación sustractiva	72
4.7 Construcción de bibliotecas sustractivas	77
4.8 Caracterización de las bibliotecas sustractivas	80

4.8.1 Amplificaciones por PCR con iniciadores anidados	80
4.8.2 Construcción e hibridación de los arreglos de ADNc	82
4.8.3 Secuenciación y análisis de las secuencias de algunas clonas	85
V. DISCUSION	87
VI. CONCLUSIONES	91
VII. PERSPECTIVAS	92
VIII. REFERENCIAS	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción mundial de Chile en el año 2001	5
Tabla 2. Clasificación de los geminivirus	9
Tabla3. Hibridación sustractiva y despliegue diferencial	25
Tabla 4. Mezcla de reactivos para PCR, amplificación de la región común del PHV	34
Tabla5. Guía para optimización de ciclos por PCR	41
Tabla 6. Ligación de adaptadores	50
Tabla 7. Reactivos para la primera hibridación	50
Tabla 8. Reactivos para la primera amplificación por PCR	54
Tabla 9. Reactivos para la segunda amplificación por PCR	54
Tabla 10. Tamaño estimado de fragmentos de genes que se prenden	79
Tabla 11. Tamaño estimado de fragmentos de genes que se apagan	79
Tabla 12. Resultados de la comparación en Genbank de los ADNc secuenciados	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países a nivel mundial productores de chile	5
Figura 2. Estructura típica de geminivirus	9
Figura 3. Mapa genómico del virus huasteco del chile (PHV)	11
Figura 4. Mapa genómico de la construcción dimérica del componente A de PHV	27
Figura 5. Mapa genómico de la construcción dimérica del componente B de PHV	27
Figura 6. Mapa genómico de TOPO PCR 2.1	28
Figura 7. Diagrama del método Biobalística	31
Figura 8. Representación gráfica de síntesis de ADNc. Método SMART	39
Figura 9. Representación gráfica de Hibridación sustractiva	47
Figura 10. Diagrama de hibridación y detección de señal. Método ECF	61
Figura 11. Planta infectada con virus y planta infectada sin virus	66
Figura 12. Extracción de ADN genómico de plantas de chile	66
Figura 13. Detección de PHV en plantas de chile	68
Figura 14. Extracción de ARN de plantas de chile	68
Figura 15. Optimización de ciclos por PCR para amplificación de ADNc	71
Figura 16. Digestión con la enzima de restricción <i>Rsa</i> I	71
Figura 17. Hibridación sustractiva de fragmentos de genes que se prenden por presencia de virus en la planta de chile	75
Figura 18. Hibridación sustractiva de fragmentos de genes que se apagan por presencia del virus en la planta de chile	75
Figura 19. Amplificación por PCR con iniciadores anidados	76
Figura 20. Transformantes	78
Figura 21. Digestiones con la enzima de restricción <i>EcoR</i> I	78
Figura 22. PCR's utilizando iniciadores anidados para la construcción de los arreglos	81
Figura 23. Sondas marcadas con fluoresceína	84
Figura 24. Arreglos de ADNc hibridados	84



I. INTRODUCCION

El chile, el maíz y el frijol, tienen una larga tradición cultural en México. La historia ha permitido conocer que existen restos arqueológicos del cultivo de chile que datan de 5,000 a 7,000 A.C., en el Valle de Tehuacan, Puebla (Laborde *et al.*, 1984; González *et al.*, 1991).

El maíz, frijol, chile y calabaza fueron la base de la alimentación en las diferentes culturas que poblaron Mesoamérica. De estos cultivos, el único que juega un papel diferente, es el chile (*Capsicum annuum* cuyo nombre viene del náhuatl chilli) no solo es un condimento extraordinario también es un alimento de gran valor nutritivo. Es uno de los frutos, con mayor concentración de ácido ascórbico. Los chiles frescos contienen más vitamina C que el limón y la naranja y casi seis veces más que la toronja; los secos por su parte contienen vitamina A en una proporción mayor que, las zanahorias y poseen además cantidades significativas aunque menores, de vitamina E y B y algunos minerales. Ha sido seleccionado por su aportación para condimentar la dieta; actualmente, el ají o chile es la especie más consumida en el mundo (Laborde *et al.*, 1984).

El género *Capsicum* (Solanaceae) consta de aproximadamente 30 especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. De ellas, *Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* son domesticadas. Se considera que *C. annuum* fue domesticada en México (Pickersgill, 1971) y de todas las especies domesticadas es la de mayor importancia económica en el país y en todo el mundo. Es además, la especie que presenta mayor variabilidad en tamaño, forma y color de los frutos. Algunos de los tipos de chiles más importantes de esta especie son los chiles "serranos", "jalapeños", "morrón", entre otros (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998; Tewksbury *et al.*, 1998; Godinez-Hernández *et al.* 2001).



México es considerado el 2º productor de chile a nivel mundial (FAOSTAT 2001). Sin embargo este cultivo şufre pérdidas de entre un 20 y un 100%, debido principalmente a enfermedades virales, entre las cuales destacan las causadas por geminivirus (Godinez-Hernández *et al.*, 2001).

A partir de 1966 las enfermedades virales en el cultivo de chile comenzaron a causar daño económico. En ese año se registraron las primeras pérdidas en el sur de Tamaulipas. Desde entonces, el problema se ha ido incrementando y estas enfermedades han invadido nuevas regiones en las cuales no existía la enfermedad. Actualmente, la magnitud del problema de los virus es similar al de la marchitez del chile (enfermedad causada por *Phytophthora capsici*) y en algunas regiones, como Veracruz, Yucatán y el sur de Tamaulipas, es aún más severo (Torres *et al.*, 2000)

Entre los principales patógenos virales en cultivos de chile en México son: El virus huasteco del chile (PHV) y el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) (Méndez-Lozano *et al.*, 2003).

Este trabajo forma parte de un proyecto que pretende encontrar y caracterizar la interacción chile-geminivirus y fuentes de resistencia natural a geminivirus en colectas de chile. Para lo anterior en el presente estudio se elaboraron y caracterizaron bibliotecas sustractivas de ADNc bajo condiciones de supresión por PCR de plantas susceptibles. Esta información junto con estudios a la par de éste, en donde se elaboran bancos sustractivos bajo condiciones de supresión por PCR de plantas resistentes, servirán para conocer a nivel molecular la interacción chile-geminivirus y eventualmente encontrar genes relacionados con respuesta a estrés y posiblemente en respuesta general a geminivirus, genes relacionados en patogenicidad y resistencia. Con estas estrategias, esperamos a mediano plazo, poder conocer a más detalle la interacción chile-geminivirus y diseñar estrategias de resistencia mas efectivas contra estos virus en este importante cultivo para nuestro país.



II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen e Importancia del chile.

En la época prehispánica, los términos en náhuatl, cococ, cocopatic y cocopalatic, se utilizaban para categorizar la gran variedad de chiles según su grado de pungencia: picantes, muy picantes y picantísimos (Torres *et al.*, 2000).

Junto con la calabaza, el maíz y el frijol, el chile (*Capsicum annum*) fue la base de la alimentación de las culturas de Mesoamérica, que es su lugar de origen y donde se considera fue domesticado. La historia sobre el uso prehispánico del chile ha quedado registrada en algunos textos: entre los escritos acerca de las comidas de los mexicas, fray Bernardino de Sahagún reseñó desde los manjares exclusivos del emperador hasta los más modestos bocados de los plebeyos, y en ese abanico de platillos el ingrediente común era el chile (Laborde *et al.*, 1984).

El chile fue llevado de América a España y de ahí se dispersó a varios países de Europa, de Asia y posteriormente de África, convirtiéndose así en un cultivo de uso mundial. Actualmente en países como China, la India, Nigeria, Hungría y Yugoslavia, el chile, además de ser muy común en el sector alimentario, es un producto que alcanza volúmenes de producción muy superiores a los de los países productores de América, de donde es originario (Gobierno del estado Zacatecano 1998-2004).

Todos los chiles son del género *Capsicum* de la familia de las Solanáceas. Los estudios taxonómicos coinciden en que son cinco las especies cultivadas: *Capsicum baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annum*, de las cuales ésta última es la más importante. *C. annum* agrupa la mayor diversidad de chiles, ya sean cultivados o silvestres. Entre los más populares destacan el guajillo o mirasol, el piquín, el de árbol, el serrano, el jalapeño, el



poblano, y el chilaca, de los cuales los tres últimos, una vez secados, se denominan chipotle, ancho o mulato y pasilla, respectivamente. El cultivo de *C. annuum* se adapta a los diversos climas y tipos de suelo del país, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2500 m. El chile habanero (*C. chinense*) y el manzano (*C. pubescens*) son originarios de Sudamérica pero en nuestro país son ampliamente conocidos, especialmente en las regiones donde se cultivan: el habanero en Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco; el manzano, también conocido como ciruelo o perón, sólo prospera en lugares altos que superen los 2000 msnm como en la Sierra de Puebla, en Veracruz, en Chiapas y en algunas zonas de Michoacán. Fresco o seco, el chile se consume de muy diversas maneras: el fresco generalmente como verdura o condimento, el seco –ancho, mulato, mirasol y pasilla principalmente– se destina a la industria artesanal del mole. Actualmente también se usa para extraer un pigmento rojo que se emplea para colorar embutidos, tales como chorizo y salami, y en la industria avícola se mezcla con los alimentos balanceados para producir huevos con yema de color más rojizo, e incluso en la elaboración de cosméticos (González *et al.*, 1991; Hernández-Verdugo *et al.*, 1998).

México es el país del mundo con la mayor variedad genética de *Capsicum*, pero curiosamente no es el productor más importante, ya que ocupa el 2º lugar después de China y esto se debe por los bajos rendimientos que registra, los cuales oscilan alrededor de 10 ton/ha, mientras que España y Estados Unidos por ejemplo, registran, según la fuente consultada (FAO), rendimientos promedios de 41 y 31 t/ha respectivamente (Gobierno del Estado Zacatecano 1998-2004).

La producción de chile a escala mundial se localiza principalmente en China, México, Turquía, España, Estados Unidos, Nigeria e Indonesia. Ver figura 1.

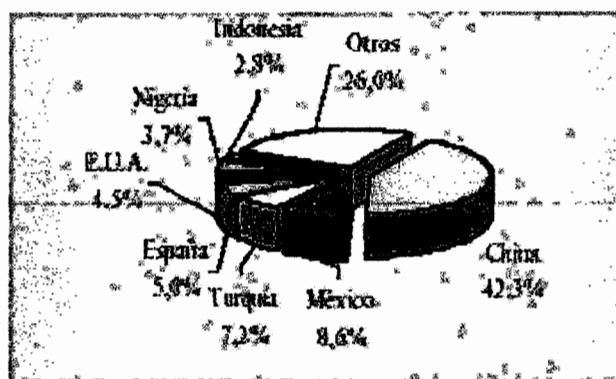


Figura 1. Principales países a nivel mundial productores de Chile.

Fuente: SIM-CNP con información de FAO, a set 2002. <http://www.fao.org>

Tabla 1. Producción mundial de Chile en el año 2001

	Producción (toneladas)	Superficie sembrada (miles de has)	Rendimiento (ton/ha)
Mundial	19,495,034	1,491.6	13.1
China	8,238,000	443.4	18.6
México	1,670,000	157.4	12.5
Turquía	1,400,000	70.0	20.0
España	965,200	23.3	41.4
E.U.A.	885,630	28.6	31.0
Nigeria	715,000	90.0	7.9
Indonesia	550,000	185.0	3.0
Egipto	448,331	27.4	16.3
Italia	380,876	14.5	26.2
Rep. de Corea	380,000	76.2	5.0

Fuente: Agroenlinea.com con datos del FAOSTAT.



En lo que se refiere a la participación de los principales estados productores del país, se puede mencionar que en México, existe una fuerte orientación hacia la producción de chile verde, situación que prevalece en los estados de Sinaloa, Sonora, Oaxaca, Nayarit, Chiapas, Colima, Veracruz, Jalisco y Tamaulipas. Cabe destacar que en su conjunto estos 9 estados conforman el 94 % del total de la producción nacional (<http://www.agroenlinea.com>).

2.2 Principales Enfermedades en el Cultivo de Chile.

Igual que los animales, las plantas contraen enfermedades, tanto infecciosas (provocadas por otro ser vivo) como no infecciosas (que se deben a factores genéticos o ambientales). En términos generales, las enfermedades causan pérdidas económicas por disminución de la cantidad y calidad de los productos a cosechar (biomasa, flores y semillas o frutos), además de incrementos en los costos de producción por la necesidad de utilizar productos agroquímicos o semillas más resistentes a ciertos agentes patógenos (Lenardon, 2003).

El hombre ha sabido de las enfermedades de las plantas desde los primeros días de la antigüedad. Esto se comprueba en el Antiguo Testamento, donde los mildius y tizones se mencionan junto con la guerra y las enfermedades humanas, como los grandes azotes de los pueblos. El gran filósofo Teofastro (370-286 a. de C.) fue el primero en estudiar y escribir acerca de las enfermedades de árboles, cereales y leguminosas, aunque su estudio se basó en observaciones y especulaciones más que en experimentos (Rojas *et al.*, 1993).

Las enfermedades que a continuación se describen brevemente, son las principales que se reportan en cultivos de chile.

Cenicilla o mildiu. Esta enfermedad es causada por el hongo *Leveillula taurina*, se desarrolla solo en tejido vivo, el hongo crece dentro de las hojas. Dentro de sus hospederos se encuentra el chile y el tomate, el primer síntoma es la



aparición de manchas blancas, con halos grises en las orillas, una vez que se infesta el cultivo es difícil su control, sin embargo su prevención es sencilla y se realiza con productos a base de azufre (Torres *et al.*, 2000).

Secadera o marchitez del chile. El cultivo de chile en México, tradicionalmente ha sido afectado por el hongo *Phytophthora capsici*; esta enfermedad provoca muerte prematura en la planta, la infección ocurre en las raíces o en la base del tallo, las plantas enfermas se marchitan con rapidez, mostrando la raíz seriamente dañada. El hongo puede sobrevivir en el suelo por periodos prolongados o en residuos de cosecha (Torres *et al.*, 2000).

Secadera por *Verticillium*. Su agente patógeno causal es el hongo *Verticillium* sp. Éste ataca en las últimas etapas del cultivo, a diferencia del hongo *Phytophthora* sp. las raíces no se ven dañadas, es un hongo que sobrevive en residuos de cosecha y en suelo, por periodos largos (Torres *et al.*, 2000).

Secadera por nematodos: el agente causal es el nematodo *Meloidogyne incognita*, se alimenta de las raíces de su hospedero para completar su ciclo de vida (Torres *et al.*, 2000).

El cultivo de chile en México hasta hace algunos años era afectado principalmente por hongos; sin embargo, a partir de 1966 se ha venido observando la aparición de enfermedades causadas por virus, las cuales debido a la gravedad del daño que están causando y a su rápida diseminación hacia la mayor parte de las áreas chileras del país, se les considera junto con la "marchitez del chile" como los problemas más importantes de este cultivo. El virus huasteco del chile (PHV) y el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) son considerados los principales patógenos virales en cultivos de chile en México (Torres *et al.*, 2000).



2.3 Geminivirus.

El nombre de geminivirus fue acuñado por Harrison *et al* en el año 1977, siendo aceptado por el Comité Internacional para la Taxonomía Viral (ICTV) en 1978. Los geminivirus son virus fitopatógenos cuyo genoma esta constituido por 1 ó 2 moléculas de ADN de cadena circular sencilla, con un tamaño que oscila entre 2.5 – 2.9 Kb (Fontes *et al.*, 1992; Azzam *et al.*, 1994).

La palabra “geminivirus” tiene su origen en la morfología característica que se observa bajo el microscopio electrónico, su apariencia es de dos poliedros regulares idénticos (gemelos) fusionados por una de sus caras (Arguello-Astorga *et al.*, 1994; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

Los geminivirus pertenecen a la familia *Geminiviridae*, se clasifican en cuatro géneros de acuerdo con el vector que los transmite, la planta hospedera a la que infectan y la organización de su genoma. En el género *Mastrevirus* pertenecen geminivirus con un solo componente genómico (Monopartitas) que infectan solamente plantas monocotiledóneas y son transmitidos por varias especies de chicharritas (*Cicadulina* spp.). El género *Curtovirus* también son monopartitas e infectan plantas del tipo dicotiledóneas y son transmitidas por chicharritas (*Cuculifer tenellus*). El género de los *Begomovirus* esta compuesto por virus de dos componentes genómicos (Bipartitas) que infectan hospederos de la clase dicotiledóneas y son transmitidos por mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y el género *Topocuvirus*, son virus monopartitas, transmitidos por chicharritas e infectan dicotiledóneas (Gardiner *et al.*, 1998; Crisanto, 2000; Ramos *et al.*, 2003). Esta información se encuentra resumida en la tabla 2.

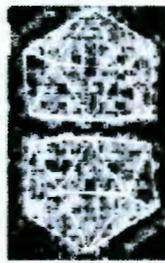
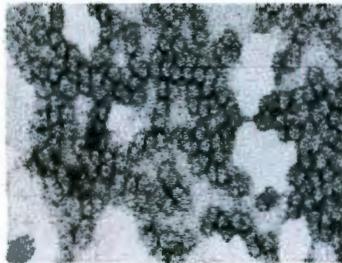


Figura 2. Estructura típica de geminivirus.

Tabla 2. Clasificación de los geminivirus

Géneros	Estructura genómica	Insecto Vector	Planta Huésped	Miembro Tipo
<i>Mastrevirus</i>	Monopartita	Chicharrita	Monocotiledóneas	MSV
<i>Curtovirus</i>	Monopartita	Chicharrita	Dicotiledóneas	BCTV
<i>Begomovirus</i>	Bipartitas	Mosquita blanca	Dicotiledóneas	BGMV
<i>Topocovirus</i>	Monopartita	Chicharrita	Dicotiledóneas	TPCTV



Los geminivirus atacan varios cultivos, entre los que destacan el tomate, el chile, el frijol, la lenteja y el tabaco, en cualquier etapa de su desarrollo, desde plántulas en invernadero hasta plantas en producción (Rojas *et al.*, 1993; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993, 2002).

2.4 El Virus Huasteco del Chile.

El virus huasteco del chile (PHV) es un geminivirus transmitido por la mosquita blanca, causa serios daños a los cultivos de chile en México y el suroeste de los Estados Unidos (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). El PHV pertenece al género de los *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae* (tabla 2). Fue aislado por primera vez en Tamaulipas (Garzón-Tiznado, *et al.*, 1993) y posteriormente caracterizado a nivel molecular (Torres-Pacheco *et al.*, 1993, 1996).

Este virus es de naturaleza “bipartita”, es decir, su genoma esta constituido por dos componentes (denominados A y B). Además es importante señalar que los dos componentes son indispensables para la infectividad (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1993) El componente A codifica para las proteínas virales requeridas para la replicación y transcripción del ADN viral: AL1 (Rep), AL2 (TrAp) y AL3 (Ren) y la proteína de la cápside AR1 (CP). El componente B codifica para las proteínas MP y NSP involucradas en el movimiento del virus en la planta (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Ambos componentes muestran una región intergénica (IR) la cual incluye un segmento de 180 a 200 nucleotidos casi idéntico en ambos componentes y conocido como región común. Todos los geminivirus tienen un elemento con potencial para formar una estructura tallo-asa (stem-loop) la cuál funciona como sitio de inicio de la replicación de estos virus mediante el mecanismo de círculo rodante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). La estructura tipo tallo-asa (~30 nt) es conservada entre los geminivirus bipartitas (Lazarowitz 1992; Pascal *et al.*, 1993, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1995; Ruíz-Medrano *et al.*, 1999). La figura 3 muestra el mapa genómico de PHV.

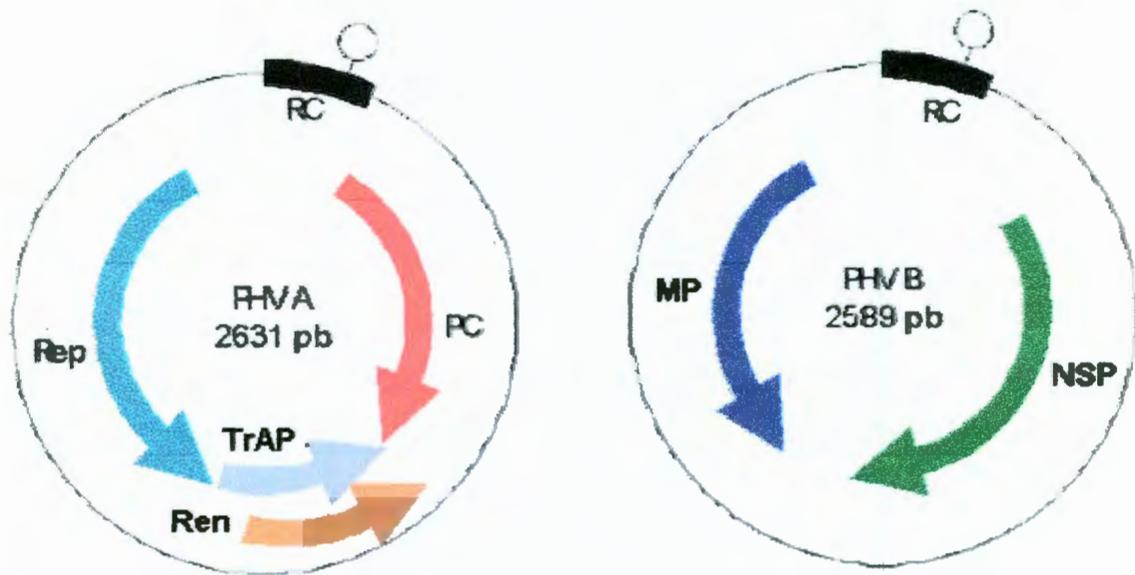


Figura 3. Mapa genómico del Virus Huasteco del Chile (PHV).



Los síntomas de infección en Chile por PHV son:

- Distorsión de la hoja
- Amarillamiento de nervaduras
- Hojas onduladas
- Arrugamiento de hojas
- Impedimento de crecimiento de la planta
- Reducción en la producción

El virus PHV ha sido detectado mediante técnicas de hibridación molecular "dot-blot" y PCR en los estados de Sinaloa, Tamaulipas, Guanajuato y Quintana Roo en México, y en el sur de Texas en los Estados Unidos (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). El PHV es el geminivirus más ampliamente distribuido y el virus que más daños causa en los cultivos de Chile y tomate en México (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001)

El control de PHV está basado en aplicaciones frecuentes de insecticidas tóxicos para limitar la población del vector. A pesar de estas medidas la producción de Chile continúa disminuyendo mientras los niveles de contaminación por insecticidas se han incrementado en regiones hortícolas de México. Por lo anterior se estima que son necesarias fuentes alternativas de resistencia a geminivirus en especies de Chile mexicano (Laborde *et al.*, 1984).

2.5 Patogenicidad en Plantas por Geminivirus.

Los primeros reportes sobre posibles enfermedades causadas por geminivirus aparecen desde el siglo VII D.C. Un poema japonés escrito por la Emperatriz Koken en el año 752 describe un amarillamiento en *Eupatorium lyndleyanum* que muy probablemente fue el resultado de una infección por un geminivirus, el virus del enrollamiento de la hoja del tabaco (TLCV). Casi mil años después, aparece lo que se considera fue el primer registro de un problema geminiviral de importancia económica, cuando Warburg describió una enfermedad en yuca en 1894. Sin embargo fue hasta la década de los 80's cuando se estableció con claridad la morfología de los geminivirus (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000). Los geminivirus son virus de ADN de cadena sencilla circular, su genoma es bipartita, es decir, está compuesto por 2 componentes A y B;



ambos componentes son necesarios para generar infección sistémica en la planta hospedera (Sueter y Bisaro, 1991,1992)

Los geminivirus probablemente se encuentran distribuidos en todas las áreas hortícolas del país. La sintomatología causada por los geminivirus puede ser similar a la causada por deficiencias nutrimentales y a los inducidos por otras familias de virus, principalmente los Potyvirus y los Tobamovirus, lo cual ha dificultado el diagnóstico de los geminivirus mediante las técnicas convencionales. De forma general se pueden incluir los siguientes síntomas, ya sean aislados o en combinación: mosaico amarillo brillante, moteado clorótico, clorosis foliar marginal, enrollamiento foliar, epinastias, otras deformaciones foliares como abultamientos o ampollamientos, reducción del área foliar, enanismos, abscisión floral, amarotamiento foliar, reducción del tamaño de los frutos, etc. (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000). Los principales cultivos agrícolas atacados por geminivirus son: maíz, caña de azúcar, tabaco, remolacha, tomate, frijol, yuca, algodón, melón, chile, calabaza, sandía, papaya, camote y soya (Rojas *et al.*, 1993) Aunque no hay estudios formales de pérdidas ocasionadas por geminivirus, los datos comunicados por los productores son dramáticos, de entre un 20-100% (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000).

Para infectar exitosamente a plantas y causar enfermedad, un virus de plantas debe cruzar la barrera de la pared celular para moverse de célula a célula y llegar al floema; deben moverse de la célula original inoculada y extenderse sistémicamente a través de su planta hospedera (Hammond-Kosack y Jones, 1997).

Los virus de plantas realizan lo anterior por codificación de proteínas de movimiento, las cuales no son esenciales para la replicación y encapsidamiento viral, pero si requeridas para la infección sistémica del hospedero. Este movimiento sistémico ocurre por 2 vías: (1) el llamado movimiento a corta distancia, el cual involucra movimiento del virus de célula a



célula; y (2) el movimiento a gran distancia, involucra que el virus llegue hasta el sistema vascular y sea transportado a partes distantes de su planta hospedera. Los virus de plantas codifican proteínas de movimiento. Estudios hasta hoy en día, indican que MP (BL1) y NSP (BR1) en geminivirus bipartitas codifican para proteínas de movimiento (Lazarowitz, 1992).

Uno de los procesos involucrados en plantas por enfermedades virales es la reducción de fijación de carbono en las hojas la acumulación de almidón en hojas causa alteraciones en la textura y color de las mismas. La infección con geminivirus, también decrementa el contenido de clorofila y reduce la producción de fotosíntesis (Ool y Yahara, 1999). Proteínas de movimiento en plantas pueden significativamente reducir compuestos fotoasimilados en tejidos y esto impide el crecimiento y desarrollo. Plantas transgenicas de tabaco que expresan el virus del mosaico del tabaco (TMV) muestran interferencia con el metabolismo de carbohidratos y su exportación al tejido mesófilo. Plantas de tabaco transgenico con BC1 muestran acumulación de almidón, presumiblemente debido al deterioro de los fotoasimilados y muestra síntomas inducidos por infección de geminivirus (Duan *et al.*, 1997).

La infección por geminivirus se asocia con grandes cambios citopatológicos en el núcleo celular de la planta. Los cambios en la morfología nuclear incluyen hipertrofia nucleolar y segregación de los componentes del nucleolo en regiones granulares y fibrilares discretas, que toman una apariencia de anillos fibrilares densos, finalmente aparecen las partículas virales en el nucleoplasma. En todos los casos estudiados de infecciones por geminivirus, estos efectos citopatológicos, y la acumulación de partículas virales, confinados al núcleo de las células infectadas, ha llevado a la suposición que la replicación del ADN viral y ensamble viral toma lugar dentro del núcleo (Kyug-Soo y Key-Woon, 1992; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000).



2.6. Papel que juegan los genes que codifican para proteínas virales en la infección de las plantas.

Todos los virus dependen de la maquinaria de síntesis de ácidos nucleicos de sus hospederos para replicar su genoma (Nagar *et al.*, 2002). En el caso de los geminivirus, el componente A es esencial para virulencia, replicación y encapsidación del ADN viral; mientras que el componente B es responsable del movimiento del virus en la planta (Sunter y Bisaro, 1991, 1992; Ool y Yahara, 1999).

Se desconoce la secuencia precisa de eventos durante el proceso de infección, pero se ha propuesto un modelo en el cual se ilustra la regulación temporal y espacial de los genes virales. En el caso de los geminivirus el proceso inicia con la eliminación de la cápside (desencapsidamiento) del virus y la entrada de su ADN al núcleo celular. En el núcleo tiene lugar la síntesis de la cadena complementaria, un proceso dependiente de la maquinaria biosintética celular: de este modo se generaría la forma viral transcripcionalmente activa y tendría lugar la expresión de los genes que son necesarios en las etapas tempranas de la infección, como Rep, TrAP y Ren. Después de la expresión de los genes tempranos por parte de los factores del huésped, se regula la expresión de los genes tardíos, como la cápside y los genes del movimiento, que codifican para las proteínas de movimiento MP (BL1) y NSP (BR1) en geminivirus bipartitas con intervención de la proteína TrAP (Lazarowitz, 1992; Sanderfoot *et al.*, 1996). Finalmente se procedería con el ensamble de las nuevas partículas virales y su disseminación en la planta (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000).

El virus del mosaico dorado del tomate (TGMV) se replica en células diferenciadas de plantas, usando la maquinaria de síntesis de ADN de su hospedero. La proteína Rep de TGMV (también conocida como AL1, AC1) es requerida para su replicación de ADN, Rep es una proteína multifuncional que se une al origen de replicación, corta el ADN para iniciar la replicación por



círculo rodante, forma oligómeros y localiza el núcleo de las células para infectarlas. Ren (también conocida como AL3, AC3) interactúa con Rep, incrementando la acumulación de ADN en plantas infectadas y al igual que la proteína Rep localiza el núcleo de células para infectarlas. Ambos Rep y Ren también interactúan con pRBR, un homólogo en plantas a la proteína retinoblastoma supresora de tumores pRB (Nagar *et al.*, 2002). Mutaciones en la proteína de la cápside y Ren retrasan y atenúan síntomas, mientras que mutaciones en TrAP (también conocida como AL2) destruyen la infectividad en plantas, pero no se impide la replicación de ADN viral (Sunter y Bisaro, 1991; Fontes *et al.*, 1994).

En geminivirus monopartitas es absolutamente requerida la proteína de la cápside (CP) para infectividad, mientras que en mutantes nulas en proteína de la cápside de geminivirus bipartitas pueden infectar plantas sistemáticamente. Pooma *et al.* 1996, sugiere que la proteína de la cápside es requerida específicamente para el movimiento sistémico. La dispensabilidad de CP está correlacionada con el grado de adaptación hospedero-virus. TGMV (virus del mosaico dorado del tomate) está bien adaptado a *N. benthamiana* y no requiere CP para infectar su hospedero sistémicamente, mientras que BGMV (virus del mosaico dorado del frijol) está pobremente adaptado a *N. benthamiana* y requiere CP. Por lo tanto el movimiento de geminivirus bipartita en planta puede ser de 3 tipos: movimiento local, célula a célula que no requiere CP, movimiento sistémico dependiente de CP, el cual ocurre en todos los hospederos probados y movimiento sistémico independiente de CP, lo cual ocurre en hospederos en donde el virus está bien adaptado a la planta (Pooma *et al.*, 1996; Guevara-González *et al.*, 1999).

Gardiner *et al.* 1998 encontraron que la proteína de la cápside evidentemente influencia patogénesis en *N. benthamiana* ya que mutantes de la proteína de la cápside producen retraso y disminución de síntomas comparado con aquellos producidos por TGMV tipo silvestre. Sin embargo, una posible interpretación de los resultados obtenidos de mutantes de la proteína de la cápside de TGMV



es que la encapsidación del ADN viral facilita la propagación a través de varios tejidos del hospedero y la rápida propagación del virus a un número mínimo de células es necesaria para la observación de enfermedad. En la ausencia de proteína de la cápside, la propagación sistémica no ocurre lo suficientemente rápido para causar clorosis y rizado que son características del desarrollo de recientes hojas infectadas por TGMV. Alternativamente la proteína de la cápside puede directamente influenciar en la producción de síntomas, tal vez a través de interacciones con otra función viral o del hospedero aun no definidas en la actualidad. Cualquiera que sea el mecanismo, es claro que la patogénesis es un proceso complejo que involucra funciones codificadas por componentes del genoma viral, incluyendo la proteína de la cápside (Gardiner *et al.*, 1998).

Células infectadas con TGMV, acumulan antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y factor δ de la ADN polimerasa. Una de las funciones de PCNA es la replicación y reparación de ADN. PCNA y ADN polimerasas se expresan principalmente en la fase S del ciclo celular. La participación de proteínas para la síntesis de ADN del hospedero asociadas con actividad de ciclo celular se correlaciona con un incremento de cromatina condensada en núcleos infectados con TGMV, estos resultados sugieren que TGMV induce condiciones favorables para replicación de ADN viral y del hospedero. (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Gutierrez, 2000; Nagar *et al.*, 2002).

Virus de ADN que causan tumores en mamíferos establecen condiciones para la replicación de ADN, inactivando proteínas supresoras de tumores, como pRB y p53 y sobreexpresan proteínas asociadas en replicación de ADN, como PCNA, TGMV puede utilizar una estrategia similar debido a que la proteína Rep interactúa con pRBR, también es capaz de inducir la producción PCNA en células diferenciadas de plantas (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000; Egelkrout *et al.*, 2001).



La incorporación de BrdU (5-bromo-2-deoxyuridina) a órganos intactos de *N benthamiana* infectados por TGMV permitió demostrar, que TGMV replica su ADN en una variedad de células diferenciadas: mesófilos, células epidermales, vasculares, medula y células corticales de hoja, tallo y raíz (Nagar *et al.*, 2002).

2.7 Resistencia Sistémica Adquirida en Plantas.

Los científicos y naturalistas han observado que cuando las plantas sobreviven a infección por patógenos, desarrollan un incremento en su resistencia a subsecuentes infecciones (Ryals y Ward, 1994).

Una reacción de las plantas a infección por patógenos es la inducción de un amplio espectro perdurable de resistencia sistémica a subsecuentes infecciones. Esta respuesta inducida de resistencia a enfermedad ha sido conocida por nombres como inmunidad adquirida fisiológica o resistencia inducida, mas recientemente como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). SAR es un repertorio de resistencia a enfermedades integrado en las plantas. SAR parece ser distinto a mecanismos como barreras fisiológicas o proteínas transmembranales (cross-linking) y también de otros mecanismos de resistencia inducible como, biosíntesis de fitoalexinas, respuesta hipersensible y cambios fisiológicos inducidos por etileno. Además SAR no está relacionado con heridas y estrés osmótico (Ryals y Ward, 1994; Hammond y Jones, 1997).

El primer estudio sistemático de SAR fue publicado por Ross en 1961. Usando TMV (virus del mosaico del tabaco) en lesiones locales, Ross demostró que infecciones por TMV fueron limitadas por infecciones previas. Esta resistencia fue efectiva no solamente para TMV sino también para el virus de necrosis del tabaco y algunos patógenos bacterianos. Ross acuñó el término como "Resistencia Sistémica Adquirida" para referirse a una resistencia sistemática inducible y "Resistencia Localizada Adquirida" para describir la resistencia inducida en hojas inoculadas (Ryals y Ward, 1994).



Desde los pasados 30 años SAR ha sido demostrado en muchas especies de plantas y el espectro de resistencia incluye virus, bacterias y hongos fitopatógenos. En 1982 Van Loon mostró que la acumulación de un grupo de proteínas extracelulares llamadas PR correlacionan con SAR. White demostró que SA (ácido salicílico) podría inducir resistencia y acumulación de proteínas PR. Como resultado SA fue considerado como una posible molécula señal endógena (Ryals y Ward, 1994).

El primer paso en el desarrollo de SAR es el reconocimiento de infección en la planta causada por el patógeno. Una vez que la planta reacciona con el patógeno, las señales son liberadas para poner en acción la resistencia tanto en tejidos adyacentes como distantes. Algo importante es que no todas las interacciones planta-patógeno dejan inducción SAR (Ryals y Ward, 1994; Hammond y Jones, 1997).

SA ha sido propuesto como una señal que deja SAR debido a que su concentración incrementa dramáticamente después de la infección del patógeno (Ryals y Ward, 1994).

Algunas clases de genes SAR codifican para β -1,3 glucanasas y quitinasas. Otra clase de genes SAR codifican un grupo de proteínas ricas en cisteínas relacionadas con taumatina, estas proteínas son conocidas por ser activas en contra de hongos. Otro grupo de genes SAR inhiben el crecimiento fúngico y están relacionados con proteínas PR (PR-1). De las proteínas PR-1 no se conoce su función bioquímica. En tabaco y en tomate éstas proteínas, tienen actividad in vitro contra *Phytophthora infestans* (Ryals y Ward, 1994).

2.8 Genes de Resistencia en Plantas.

Las plantas necesitan defenderse del ataque de virus, microorganismos, invertebrados e incluso de otras plantas. Debido a que las plantas carecen de sistema inmunológico, cada célula de la planta debe poseer la capacidad de



defensa preformada o constitutiva y defensa inducible; así se distingue la defensa de la planta del sistema inmune de los vertebrados (Nürberger y Scheel, 2001).

En interacciones “gen a gen” entre plantas y patógenos, la incompatibilidad (No enfermedad) requiere un gen de resistencia dominante o semidominante (R) en la planta y un correspondiente gen de avirulencia (Avr) en el patógeno. Muchas interacciones planta-patógeno son de este tipo. Los genes R son capaces de (a) detectar genes específicos Avr, (b) iniciar transducción de señales para activar defensas y (c) tienen la capacidad de involucrar nuevos genes R específicos rápidamente. Si el gen R o el correspondiente gen Avr no son funcionales, entonces el reconocimiento no ocurre y no se activan las defensas y la planta es susceptible a infección (McDowell *et al.*, 1998).

Los genes R codifican proteínas que pueden reconocer ligandos dependientes de genes Avr. Siguiendo con el reconocimiento del patógeno, la proteína R presumiblemente activa cascadas de señales que coordinan la respuesta inicial de defensa de la planta para no permitir el ingreso del patógeno. Un requerimiento de las proteínas R es la capacidad de rápida evolución de especificidad (Flor, 1971). Frecuentemente nuevas razas virulentas de patógenos evaden la resistencia específica mediada por genes R. Entonces es requerido un mecanismo donde las plantas puedan rápidamente desarrollar nuevos genes R para resistir aislados virulentos (Lamb, 1994; Hammond-Kosack y Jones, 1997).

Los genes R son miembros de una familia de multigenes, de diversidad funcional (Hammond and Jones, 1997). Una característica es que todos los genes caracterizados hasta hoy, codifican para proteínas con zonas ricas en leucina (LRRs). Los LRRs están presentes en una amplia variedad de proteínas y participan en interacciones proteína-proteína y unión a ligandos; se piensa que se unen a moléculas señal derivadas del patógeno y por lo tanto



permiten el reconocimiento de especificidad, aunque no hay una directa evidencia bioquímica (Collins *et al.*, 1998; McDowell *et al.*, 1998).

Dos superfamilias de LRRs codificantes de genes R para patógenos han sido definidas por motivos funcionales y localización de las proteínas codificantes (Dangl, 1995).

Una superfamilia esta representada por los genes Cf de tomate (resistencia a patógenos fungicos de *Cladosporium fulvum*) (Hammond-Kosack y Jones, 1996) y la familia de genes Xa21 en arroz (resistencia a bacterias patógenas *Xanthomonas campestris* pv *oryzae*) (Song *et al.*, 1995). Se ha predicho que las proteínas son de unión a membrana y LRRs fundamentalmente son extracitoplasmáticos. Las proteínas CfR no tienen ningún dominio reconocible de señalamiento mientras que Xa21 contiene LRRs extracitoplasmáticos unidos a dominios quinasas citoplasmáticos (McDowell *et al.*, 1998).

La segunda superfamilia de genes R, se conoce como NBS-LRR, son proteínas con sitios de unión potencial a nucleotidos y repetidos ricos en leucina (NBS-LRR). Las proteínas NBS-LRR no contienen secuencia señal de reconocimiento y probablemente su función es dentro de la célula. La mayoría de los genes NBS-LRR están comprendidos en dos subclases basados en sus motivos N-terminal (Collins *et al.*, 1998; McDowell *et al.*, 1998).

La subclase TIR-NBS-LRR esta definida por una región N-terminal que parece ser un dominio de señalamiento citoplasmático del receptor transmembranal/Toll/Interleucina I. Esta subclase incluye genes de resistencia a virus (gen N en tabaco), hongos (gen L6 en lino) y oomicetes (RPP5, RPP1 y RPP1C en *Arabidopsis*) (McDowell *et al.*, 1998).

La segunda subclase (LZ-NBS-LRR) contiene un motivo leucina en lugar del dominio TIR y esta representado por genes RPM1 (Grant *et al.*, 1995), RPS2



(Bent *et al.*, 1994) y Prf. (Salmeron *et al.*, 1996). RPS2 y RPM1 confieren resistencia a cepas de *Pseudomonas syringae*.

2.9 Estudios de la Expresión Diferencial de Genes.

En la actualidad existen diversas técnicas que nos permiten analizar la expresión diferencial de genes, las principales técnicas son:

Despliegue diferencial. Esta técnica fue desarrollada por Pardee y Liang en Harvard Medical School esta herramienta permite identificar genes expresados diferencialmente. El método involucra la transcripción reversa de los ARNm con iniciadores oligonucleotidos -dT que se anclan al extremo poli(A), seguido de una reacción de PCR en presencia de un segundo decámero de secuencia arbitraria. Las subpoblaciones de ADNc amplificadas a partir de ARNm son distribuidas en un gel de secuenciación de ADN. Mediante la combinación de los iniciadores, se puede visualizar 15,000 especies individuales de ARNm en células de mamíferos. Los fragmentos expresados diferencialmente pueden ser recuperados del gel de secuenciación y reamplificados, posteriormente pueden ser marcados radiactivamente y ser usados como sondas para identificar el correspondiente ADNc o la clona. Esta técnica ha sido empleada con éxito para clonar genes expresados diferencialmente de células animales, plantas y hongos. (Aiello *et al.*, 1994; Bos y Hadman, 1998; Matz y Lukyanov, 1998; Bockelmann y Gollnick, 1999). Esta técnica permite comparar directa y simultáneamente varias muestras con cambios en la expresión genética.

Hibridación substractiva bajo condiciones de supresión por PCR. Este método es una importante herramienta de la biología molecular, utilizado para identificar genes expresados diferencialmente, con los cuales se construyen bibliotecas sustractivas. Esta basado en la técnica de supresión por PCR, y combina la normalización y supresión en un simple procedimiento. El paso de normalización u homogeneización iguala la abundancia de ADNc (ADNs complementarios) incrementándose la probabilidad de obtener ADNs



complementarios expresados diferencialmente tanto de alta como de baja abundancia y el paso de sustracción excluye las secuencias comunes entre población control y población problema, es decir, aquellos genes constitutivos; este efecto es mediado por secuencias repetidas invertidas terminales. En cada ciclo de PCR en los pasos de desnaturalización y alineamiento, estas largas secuencias repetidas invertidas forman estructuras comúnmente llamadas "como mango de sartén", las cuales no sirven como templados para la amplificación exponencial por PCR, debido a que sus alineamientos intramoleculares son muy estables, resultando así el efecto de supresión en la amplificación por PCR. Solamente las moléculas que tienen en sus extremos diferentes secuencias, permitirán su amplificación exponencial usando PCR (Diatchenko, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999; Eickoff *et al.*, 2001).

Los arreglos de ADN se preparan empleando el material de las bibliotecas sustractivas, se colocan una serie de puntos en una membrana de nylon, cada uno de los cuales contiene una secuencia diferente de ADNc, el arreglo se pone a hibridar con las sondas (secuencia de oligonucleotidos marcada), si la sonda encuentra una secuencia complementaria hibridará y se detectará por fluorescencia (Willard *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001; Mahalingam *et al.*, 2003)

La ventaja de combinar un procedimiento basado en el fenómeno de hibridación (arreglos de ADNc) con un procedimiento basado en hibridación substractiva bajo condiciones de supresión, es que permite analizar un gran número de clonas simultáneamente. También permite la identificación de genes expresados diferencialmente sin la necesidad de emplear microarreglos de organismos que ya hayan sido secuenciados previamente (Bonaldo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999).



En este estudio, se utilizó la hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR, esta técnica fue seleccionada en lugar del despliegue diferencial, ya que ofrece ventajas que a continuación mencionaremos, ver tabla 3.



Tabla 3. Hibridación sustractiva y Despliegue diferencial.

Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR	Despliegue diferencial
La Homogeneización o normalización de transcritos, permite detectar ARNm de baja abundancia	No garantiza la detección de ARNm de baja abundancia
La supresión por PCR, permite identificar fragmentos de genes expresados diferencialmente, eliminando genes constitutivos	Compara poblaciones contrastantes, en 2 condiciones. No elimina genes constitutivos.
Se utilizan geles de agarosa	Se utilizan geles de poliacrilamida



OBJETIVO GENERAL

Detectar genes involucrados en la susceptibilidad de plantas de Chile *Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim a PHV a través del análisis de patrones de expresión genética diferencial, mediante el uso de bibliotecas sustractivas de ADNc y arreglos de ADN



OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Obtener ARN de plantas de chile *Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim infectadas con PHV y ARN de plantas de chile sin PHV.

Sintetizar ADNc a partir de los ARNm

Llevar a cabo la técnica de hibridación sustractiva

Elaboración de bibliotecas sustractivas y construcción de los arreglos de ADNc

Clonación de fragmentos diferenciales

Secuenciación y análisis de las secuencias de algunas clonas diferenciales

III. METODOLOGIA.

A. Materiales

3.1 Material vegetal

Las plantas de Chile usadas para este trabajo pertenecen al género y especie *Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim, estas plantas son susceptibles a infección por geminivirus. Los individuos fueron producidos en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Experimental Bajío (INIFAP).

3.2 Plásmidos y cepas bacterianas

El componente A y B del virus PHV, fueron insertados en el plásmido Blue Script (SK+).

Los fragmentos de ADNc expresados diferencialmente, obtenidos de la hibridación sustractiva se transformaron en el plásmido topo PCR 2.1 en el sitio de restricción *EcoR* I. La clonación se hizo utilizando cepas químicamente competentes de *E.coli* Invitrogen. La colección de colonias blancas obtenidas de dicha clonación que contenían inserto, conformaron las bibliotecas sustractivas de ADNc.

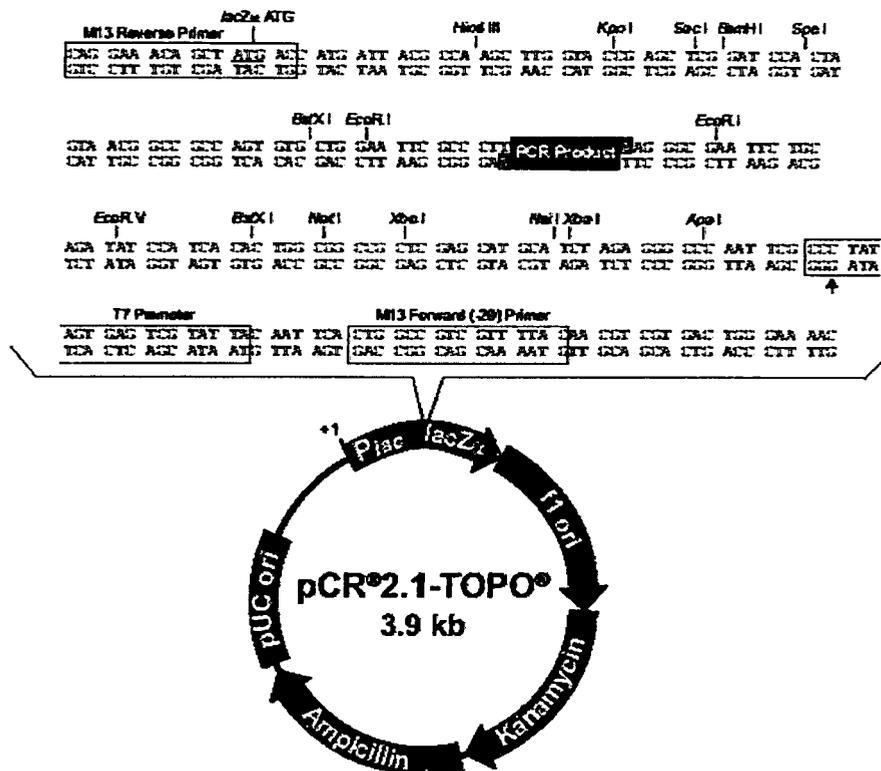


Figura 6. Mapa genómico que muestra las características del PCR TOPO 2.1 y la secuencia que bordea el sitio de clonación TOPO. Se indican los sitios de restricción y el de inserción del producto amplificado por PCR



B. Métodos

Técnicas de Biología Molecular empleadas:

3.1 Biobalística

Para la inoculación del virus PHV en plantas problema y del plasmido Blue Script (SK+) en plantas control, se utilizó la técnica de biobalística, la cual consiste en acelerar partículas de tungsteno sobre la zona apical de las hojas, mediante un gas inerte como el helio a una presión de 800lb/pg², estas partículas impactan sobre la superficie de las células de la planta y algunas de ellas se introducen en el núcleo celular, donde se lleva a cabo la replicación del virus. En la figura 7 se muestra un diagrama de este método.

Recubrimiento de las partículas de tungsteno.

1. Se mezcló en un tubo eppendorf 50 μ l de la suspensión de micropartículas de tungsteno.
2. Se agregaron los siguientes reactivos uno a uno y se mezcló bien en cada adición.

5 μ g de ADN digerido de cada componente del virus PHV
50 μ l de cloruro de calcio 2.5 M
20 μ l de espermidina 0.1 M

3. Se agitó la mezcla por 5 min y se centrifugó de 5 a 10 seg
4. Se eliminó el sobrenadante con una micropipeta
5. Se agregaron 140 μ l de etanol al 70% ayudando a la suspensión de las micropartículas con la punta de la pipeta.
6. Se centrifugó 5-10 seg.
7. Se eliminó el sobrenadante con la micropipeta
8. Se agregaron 50 μ l de etanol absoluto, se resuspendieron las partículas y se sonicaron 3 veces por 10 seg.

Disparo de las partículas



1. Se aplicaron 10 μ l de la suspensión de partículas sobre la membrana acarreadora
2. Se monto la boquilla de la pistola.
3. Se disparo sobre la zona apical de la planta

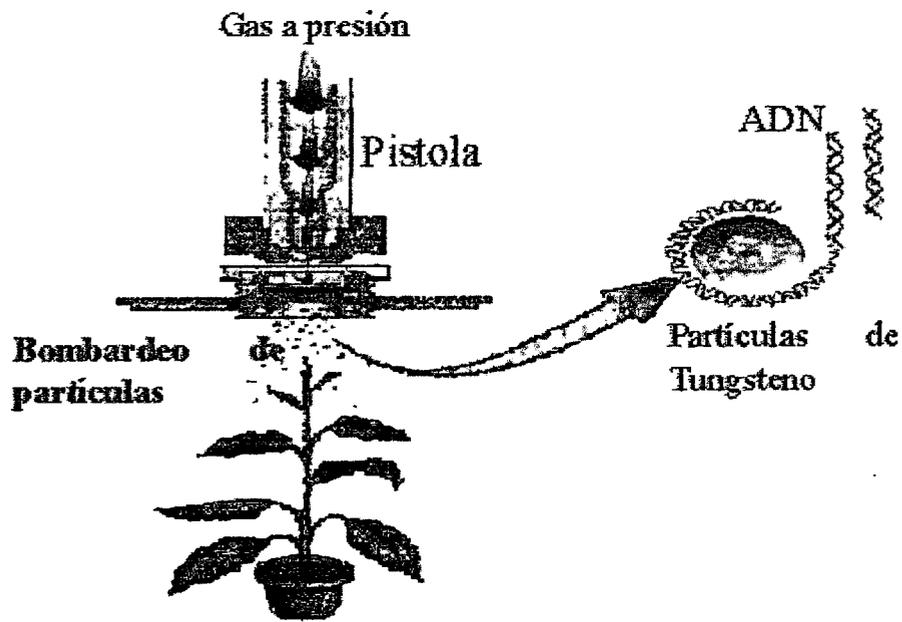


Figura 7. Diagrama del método Biobalística.



3.2 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN_T se empleó una modificación al método de extracción de ADN reportado por Shure *et al.*, 1983. Esta extracción fue necesaria para confirmar la presencia o ausencia del virus PHV en los individuos infectados y en los controles.

1. Se pesaron 100 mg de tejido vegetal
2. Se colocó el tejido en un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 ml
3. Se congeló inmediatamente en N₂ líquido
4. Se trituró el tejido congelado en un mortero con pistilo previamente esterilizado y enfriado en el N₂, hasta obtener un polvo fino

Nota: El tejido no debe descongelarse durante la trituración

5. Se agregaron 600 μ l del regulador de extracción de ADN (ver apéndice)
6. Se incubaron 10 min. a temperatura ambiente
7. Se realizó un lavado fenol-cloroformo-isoamílico (ver apéndice)
8. Se precipitó el ADN con isopropanol
9. Se solubilizó la pastilla de ADN en 30 μ L de H₂O
10. Se almacenó a -20°C , hasta su uso



3.3 Detección del PHV

Con la finalidad de garantizar que las plantas problema inoculadas con el virus habían tenido éxito en la infección y que las plantas control, inoculadas solo con el Blue Script (SK+) estaban libres del virus, se realizó análisis PCR, usando los iniciadores 240 y 241, que flanquean específicamente la región común (RC) del componente A del PHV, amplificando un fragmento de 350 pb aproximadamente.

La secuencia de estos iniciadores es:

240 5'- GGCTTATTTGTAATAAGAG -3'

241 5'- GAATTAAAGGTACATGGAC -3'



Tabla 4. Mezcla de reactivos para PCR, amplificación de la región común de PHV

Reactivos	Cantidad (μl)	Concentración
H ₂ O	100	-
Buffer 10 X REDTaq	12.5	10 X
Mezcla de deoxinucleótidos (dNTP's)	2.5	2.5 mM
DNA Polimerasa REDTaq	4	1 U/ μ l
Iniciador 240	2.5	50 ng/ μ l
Iniciador 241	2.5	50 ng/ μ l



1. Se preparo la mezcla de reacción, para la amplificación de la región común de PHV, ver tabla 4.
2. Se hicieron alícuotas de 24 μl en tubos para PCR de 125 μl
3. Se agrego 1 μl del ADN total (ADN_T) a 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (se recomienda esta concentración)
4. Se colocaron los tubos en el termociclador y se ejecuto el siguiente programa de corrida.

1 ciclo :	94 °C, 5 min
35 ciclos:	90 °C, 1 min
	55 °C, 1 min
	72 °C, 2 min
1 ciclo:	72 °C, 7 min
∞	4°

3.4 Extracción de ARN. Método RNeasy de QIAGEN

Este método combina las propiedades de unión selectiva de la membrana de silica gel de la columna provista en el protocolo y la velocidad de centrifugación. Con este procedimiento todas las moléculas ≥ 200 nucleótidos son aisladas, lo cual enriquece la extracción en los ARNm.

1. Se pesaron 100 mg de hojas de plantas control (inoculadas sin virus) y 100 mg de hojas de planta problema (inoculadas con virus).
2. Se colocó la muestra en N_2 líquido y se pulverizó completamente. Se decantó el polvo en un tubo de microcentrifuga de 2 ml libre de RNasas y se congeló en N_2 líquido, permitiendo que el N_2 se evapore pero que el tejido no se descongele.
3. Inmediatamente se adicionaron 450 μl de buffer de lisis, y se agito vigorosamente. Un corto periodo de incubación de 1-3 min a 56°C ayuda a romper el tejido.
4. Se pipeteó el lisado directamente en la columna lila QIAShedder, en la cual se lleva a cabo la homogeneización de la muestra y se colocó en un tubo de microcentrifuga, posteriormente se centrifugo 2 min. a 14,000rpm.



- Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio; sin los dentritos.
5. Se adicionaron aproximadamente 225 μ l de etanol absoluto para aclarar el lisado y se mezcló pipeteando.
 6. Inmediatamente se transfirió la muestra, incluyendo algún precipitado formado a la mini columna color rosa, en esta columna el ARN se adhiere a la membrana de silica gel. La minicolumna se pone en el tubo colector para centrifugarse 15 s a 12,000 rpm. Se desechó el fluido.
 7. Digestión con DNasa sobre la columna
 - 7a. Se Pipetearon 350 μ l del buffer RW1 dentro de la columna RNeasy, se centrifugó 15 s a 12000 rpm para lavar la columna. Se desechó el fluido.
 - 7b. Se adicionaron 10 μ l de stock DNasa, 70 μ l de buffer RDD, Se mezclo invirtiendo el tubo.
 - 7c. Se Pipeteó la mezcla de incubación de DNasa (80 μ l) directamente en la membrana de silica gel RNeasy y se incubó 20-30°C 15 min.
 - 7d. Se pipetearon 350 μ l buffer RW1 dentro de la minicolumna, se centrifugó a 12 000 rpm 15 s. Se desecho el fluido.
 8. Se transfirió la columna a un nuevo tubo limpio de 2 ml. Se pipetearon 500 μ l de buffer RPE dentro de la columna y se centrifugó a 12000 rpm 15 s para lavar la columna. Se desechó el fluido.
 9. Se adicionaron 500 μ l buffer RPE a la columna, y se centrifugó a 12000 rpm 2 min para secar la membrana de silica gel.
 - 9a. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se centrifugó a 12000 rpm 1 min. para eliminar trazas del buffer RPE
 10. Para eluir se transfirió la columna a un nuevo tubo colector de 1.5 ml. Se pipetearon 30-50 μ l de agua libre de RNasas directamente a la membrana de silica gel y se centrifugó a 12000 rpm 1 min.
 11. Si la producción de ARN es <20 μ g, se repite el paso de elusión (paso 10); con un segundo volumen de agua libre de RNasa o incluso volver a utilizar el volumen anterior. Se eluye en el mismo tubo.



3.5 Síntesis de ADNc. Método SMART de CLONTECH.

Este método está basado en la transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para producir ADNc a partir de nanogramos de ARN total o ARN poli A, con la capacidad de la transcriptasa reversa (RT) se logra retrotranscribir ARNm en ADNc de cadena simple en la primera reacción y posteriormente se amplifica este ADNc por PCR.

La transcriptasa reversa SuperScript II retrotranscribe el ARNm en ADNc de cadena simple, un oligonucleótido dT denominado CDS, dirige la síntesis de la primera cadena de ADNc. La transcriptasa reversa adiciona nucleótidos de deoxicitidina en el extremo 3' del ADNc naciente al cual se pega el oligonucleótido SMART ya que tiene una secuencia oligo de G. El anclaje SMART y la secuencia oligo dT sirven como iniciadores para la amplificación del ADNc por medio de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). La figura 8 muestra una representación gráfica de síntesis de ADNc.

3.5.1 Síntesis de primera cadena de ADN complementario.

1. Para cada muestra problema y control de ARN de placenta se combinaron los siguientes reactivos:

1-3 μl ARN problema y control	
1 μl control placenta (0.025 μg de ARNm o 0.05-1 μg de ARN total)	
1 μl oligonucleótido 3' CDS SMART IIA (10 μM)	
1 μl oligonucleótido SMART IIA (10 μM)	
X μl agua desionizada	
<hr/>	
5 μl volumen total	

2. Se mezcló y se centrifugó
3. Se incubó el tubo a 70°C por 2 min.
4. Se centrifugó el tubo para coleccionar el contenido en el fondo. Y se deja el tubo a temperatura ambiente..



5. Se adicionó el siguiente tubo de reacción:
 - 2 μ l buffer de primera cadena 5X
 - 1 μ l DTT (20 mM)
 - 1 μ l dNTP 50X (10 mM)
 - 1 μ l Advantage superscript
6. Se mezcló y se centrifugó
7. Se incubaron los tubos a 42°C por 1 h
8. Se diluyó el producto de síntesis de primera cadena adicionando un volumen de 40 μ l de buffer TE
9. Se calentaron los tubos a 72°C por 2 min.
10. Se almacenaron las muestras a -20°C (máximo 3 meses).

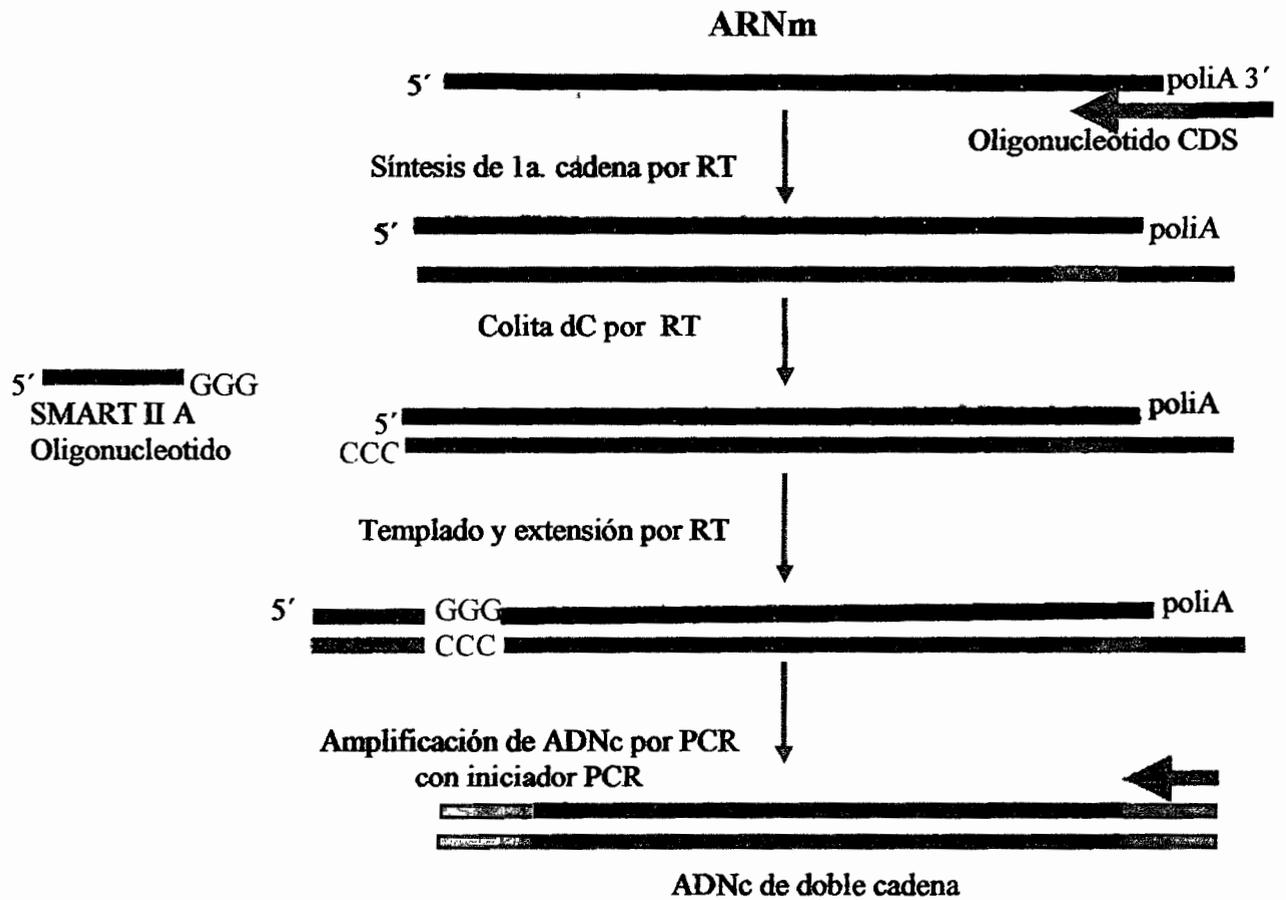


Figura 8. Representación gráfica de síntesis de ADNc. Método SMART, Clontech, 2001



3.5.2 Amplificación de ADNc por PCR.

El ADNc de cadena sencilla tiene en sus extremos secuencias que sirven como sitios de reconocimiento para el iniciador PCR (ver figura 8) y pueda iniciarse la amplificación por PCR de los ADNc. Es necesario determinar el número de ciclos óptimo de PCR para obtener ADNc que represente todos los ARNm presentes en cada condición. El rango recomendado por el protocolo es de 15, 18, 21 y 24. La tabla 5, muestra una guía de optimización de los ciclos por PCR dependiendo de la cantidad de ARN total usado en la síntesis de 1ª cadena de ADNc.



Tabla 5. Guía para optimizar los ciclos por PCR dependiendo de la cantidad de ARN total usado en la síntesis de 1^a cadena de ADNc. Esta guía fue determinada usando el control de ARNm de placenta en un termociclador Perkin-Elmer pE 480 y PE 9600; los parámetros óptimos pueden variar con diferentes templados y termocicladores.

ARN (μg)	Volumen de ADNc (μl)	No. de ciclos óptimos de PCR
~1.0	1	17-19
~0.5	2	17-19
~0.25	4	17-19
~0.1	10	17-19
~0.05	10	19-21



Para la técnica de hibridación sustractiva es necesario utilizar tres tubos para cada muestra problema y control. Por lo general cada 100 μl de reacción produce 1-3 μg de ADNc de doble cadena, después de los pasos de PCR y purificación. La sustracción requiere de 2 μg de ADNc.

1. Se precalentó el termociclador a 95°C.
2. Para cada reacción, se requiere una alícuota de volumen apropiado de cada ADNc diluido en un tubo de PCR. Si es necesario, adicionar agua desionizada para ajustar el volumen a 10 μL .
3. Se preparó la siguiente mezcla para los tubos de reacción,

1 reacción

74 μl agua desionizada
10 μl buffer advantage 2 PCR 10X
2 μl dNTP's 50X (10 mM)
2 μl iniciador PCR 5' IIA
2 μl polimersa advantage 2 50X

4. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó un pulso
5. Se adicionó una alícuota de 90 μl de la mezcla en cada tubo del paso 2.
6. Se cerraron los tubos y se colocaron en el termociclador precalentado
7. Se comenzaron los ciclos:

95°C 1 min
X ciclos
95°C 15 seg
65°C 30 seg
68°C 6 min

Para la optimización de ciclos por PCR, primeramente se sometieron todos los tubos a 15 ciclos, posteriormente se uso solo un tubo para determinar el número óptimo de ciclos por PCR, como se describe en el paso 8. Se almacenaron los otros tubos a 4°C.

8. Se determinó el número óptimo de ciclos por PCR, de la siguiente manera:



- a. Se transfirieron 15 μ l del PCR de 15 ciclos a un tubo limpio de PCR (para análisis en gel de agarosa)
 - b. Se corrieron 3 ciclos adicionales (para un total de 18) con los 85 μ l remantes de la mezcla de PCR
 - c. Se transfirieron 15 μ l del PCR de 18 ciclos a un tubo limpio de PCR (análisis en gel de agarosa)
 - d. Se corrieron 3 ciclos adicionales (para un total de 21) con los 70 μ l remanentes de la mezcla de PCR
 - e. Se transfirieron 15 μ l del PCR de 21 ciclos a un tubo limpio de PCR (análisis en gel de agarosa)
 - f. Se corrieron 3 ciclos adicionales (para un total de 24) con los 55 μ l remantes de la mezcla de PCR.
9. Se cargaron en un gel de agarosa al 1.2% 5 μ l de cada producto de reacción de PCR, para determinar el número de ciclos óptimo.
10. Los tubos almacenados a 4°C (sometidos a 15 ciclos de PCR) se colocaron nuevamente en el termociclador y se llevaron a ciclos adicionales, si es necesario hasta alcanzar el número de ciclos óptimo.
11. Se adicionaron 2 μ l de EDTA 0.5 M a cada tubo para terminar la reacción.
12. Se almacenaron los tubos a -20°C.

3.5.3 Purificación de ADNc por columna cromatográfica

1. Para todas las muestras experimental y control, se combinaron los 2 tubos de reacción del producto de PCR optimizado, en un tubo de microcentrifuga 1.5 ml.
2. Se adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y se mezcló.
3. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 10 min para separar las fases.
4. Se removió la fase acuosa (arriba) y se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml.



5. Se adicionaron 700 μ l de n-butanol y se mezcló vigorosamente. La extracción de butanol permite concentrar el producto de PCR a un volumen de 40-70 μ l.

Nota: Un exceso de n-butanol puede eliminar toda el agua y precipitar los ácidos nucleicos, si esto pasa, se adiciona agua al tubo hasta reaparecer la fase acuosa.

6. Se centrifugó a 14,000 rpm 1 min a temperatura ambiente.
7. Se removió y se descartó la fase orgánica (fase superior n-butanol)
8. Si el volumen final no es de 40-70 μ l, se repiten los pasos 6 y 7 con el mismo volumen de n-butanol.

Nota: Si el volumen es <40 μ l, se adiciona agua desionizada esteril para que la fase acuosa se ajuste al volumen 40-70 μ l

9. Se invirtió la columna CROMA SPIN-1000 varias veces para resuspender el gel de la matriz. Esta columna se utilizó para purificar el ADNc.
10. Se removió la tapa y la base del fondo de la columna y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml
11. Se descartó todo el buffer de la columna que inmediatamente se colecta en el tubo y se adicionó 1.5 ml del buffer TNE 1X.
12. Se dejó que el buffer drenara a través de la columna por flujo de gravedad, hasta ver la superficie del gel de la matriz de la columna. La parte superior de la matriz de la columna debe estar en la marca de 0.75 ml. Si la columna contiene menor matriz, se desecha y se usa otra columna.
13. Se desechó el buffer colectado y se procedió con la purificación.
14. Se aplicó cuidadosamente y lentamente la muestra en el centro de la matriz de la columna.
15. Se aplicaron 150 μ l del buffer TNE 1X y se permitió que este drenara completamente fuera de la columna.
16. Se transfirió la columna a un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5 ml
17. Se aplicaron 320 μ l del buffer TNE 1X y se colectó el eluido como la fracción purificada de ADNc de doble cadena.



18. Para confirmar que el producto de PCR esta presente en la fracción purificada de ADNc ds (de doble cadena) se hizo el análisis en geles de agarosa.

3.5.4 Digestión con *Rsa* I

Este paso genera fragmentos cortos de ADNc ds con extremos romos, necesario para la ligación de adaptadores y sustracción.

1. Se adicionaron los siguientes reactivos a la fracción purificada de ADNc colectada de la columna CROMA-SPIN

ADNc ds purificado	100 μ l
Buffer 10X de restricción <i>Rsa</i> I	36 μ l
Enzima <i>Rsa</i> I	1 μ l

2. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó
3. Se incubó a 37°C por 3 h.
4. Para confirmar que la digestion fue exitosa, se corrió un gel de electroforesis cargando 10 μ l de la muestra de ADNc sin cortar y 10 μ l de el ADNc digerido.
5. Se adicionaron 8 μ l de EDTA 0.5 M para terminar la reacción.

3.6 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR. Método PCR-Select de CLONTECH

Esta es una poderosa herramienta de biología molecular, utilizada para identificar genes expresados diferencialmente. La figura 9 muestra una representación gráfica de la hibridación sustractiva.

Las características centrales de la hibridación sustractiva son la normalización de transcritos y la supresión por PCR de los fragmentos de genes constitutivos. La homogeneización o normalización de transcritos ocurre debido al rápido proceso de alineamiento, el parámetro que controla la reacción de reasociación o hibridación es el producto de la concentración de



ADN y el tiempo de incubación, los ADNc de cadena simple de alta abundancia llegan a ser reducidos al mismo nivel que aquellos que son menos abundantes. El efecto de supresión por PCR ocurre en las moléculas que tienen en sus extremos secuencias repetidas terminales que forman estructuras estables “mango de sartén” las cuales no sirven de templado para la amplificación exponencial por PCR.

Importante: Cabe destacar que se hicieron dos tipos de hibridaciones sustractivas: a) hibridación sustractiva de genes que se prenden en presencia del virus, b) hibridación sustractiva de genes que se apagan en presencia del virus. La diferencia entre ambas es a que población de ADNc se ligan los adaptadores.

↔ Genes que se prenden en presencia del virus – los adaptadores se ligan a los ADNs complementarios provenientes de las plantas con el virus, a esta población se le considera problema.

↔ Genes que se apagan en presencia del virus – los adaptadores se ligan a los ADNs complementarios provenientes de las plantas sin virus, a esta población se le considera problema.

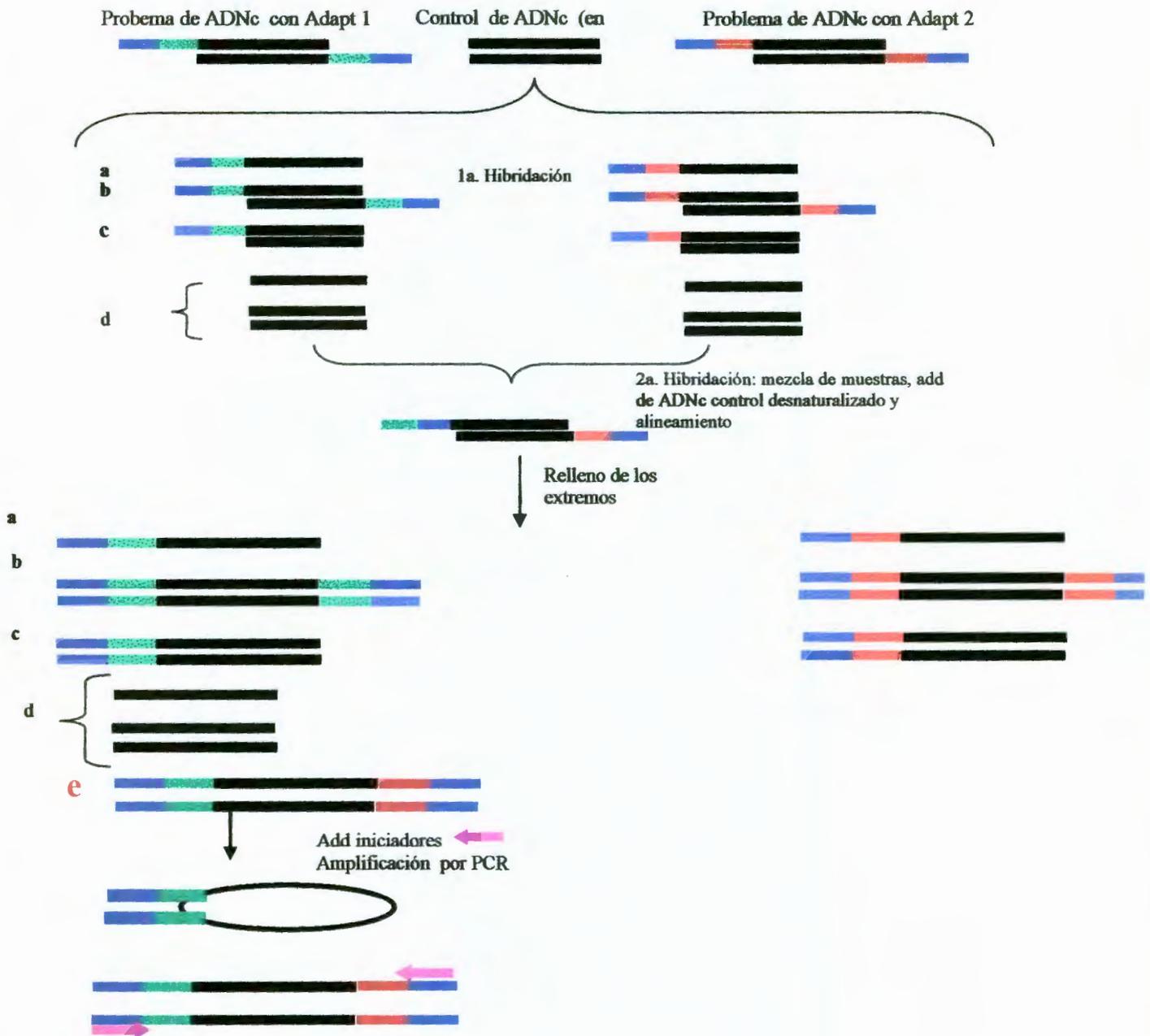


Figura 9. Representación gráfica de hibridación sustractiva.



Para purificar el ADNc digerido con la enzima *Rsa* I se procedió a utilizar el método de hibridación sustractiva.

1. Al tubo que contiene el ADNc digerido se adicionan 50 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)
2. Se mezcló vigorosamente
3. Se centrifugó 14,000 rpm 10 min para separar las fase
4. Se remueve la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio de 0.5 ml
5. Se adicionaron 50 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló.
6. Se centrifugó a 14,000 rpm 10 min para separar las fases
7. Se removió la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio de 0.5 ml
8. Se adicionaron 25 μ l de NH_4OAc 4M y 187.5 μ l de etanol al 95%.

Nota: Proceder inmediatamente con precipitación. No almacenar los tubos a 20°C, ya que una exposición prolongada a esta temperatura precipita sales.

9. Se mezcló vigorosamente.
10. Se centrifugó a 14,000 rpm 20 min a temperatura ambiente
11. Se removió el sobrenadante cuidadosamente y se desecho
12. Se cubrió la pastilla con 200 μ l de etanol al 80%
13. Se centrifugó a 14,000 rpm 5 min
14. Cuidadosamente se removió el sobrenadante y se desecho
15. Se secó la pastilla al aire 5-10 min
16. Se disolvió la pastilla en 5.5 μ l de agua y se almacenó a -20°C

Estos 5.5 μ l de muestra de ADNc digerido con *Rsa* I sirven como ADNc digerido problema y ADNc digerido control. En la siguiente sección estas muestras serán ligadas con adaptadores para crear las respectivas sustracciones.

3.6.1 Ligacion de adaptadores.

1. Se diluyó 1 μ l de cada ADNc experimental digerido en 1 μ l de agua estéril.



2. Se preparó una mezcla de ligación, combinando los siguientes reactivos en un tubo de 0.5 ml.

	Por reacción
Agua estéril	3 μ l
Buffer de ligación 5X	2 μ l
Ligasa T4 ADN	1 μ l

3. Para cada ADNc problema, se combinaron los reactivos de la tabla 6 siguiendo el orden mostrado.
4. En un tubo eppendorf se mezclaron 2 μ l de problema etiquetado como 1-1 y 2 μ l de problema etiquetado 1-2. Después de que la ligación se completó, este tubo fué el control, ya que en este tubo no se llevo a cabo sustracción.
5. Se centrifugaron los tubos y se incubaron a 16°C toda la noche
6. Se detuvo la reacción de ligación, adicionando 1 μ l de EDTA.
7. Se calentaron las muestras a 72°C por 5 min. Para inactivar la ligasa.
8. Se removió 1 μ l de cada tubo control no sustraído y se diluyó en 25 μ l de agua desionizada estéril. Esta muestra fué usada para PCR.
9. Se almacenaron las muestras a -20°C.



Tabla 6. Ligación de adaptadores

Componente	Tubo 1 Problema 1-1	Tubo 2 Problema 1-2
ADNc diluido	2	2
Adaptador 1 (10 μ M)	2	-
Adaptador 2R (10 μ M)	-	2
Mezcla	6	6
Volumen final	10	10

Tabla 7. Reactivos para la primera Hibridación.

Componente	Hibridación muestra 1(μl)	Hibridación muestra 2(μl)
ADNc control digerido con <i>Rsa</i> I	1.5	1.5
Tubo 1-1 problema, ligado al adaptador 1	1.5	-
Tubo 1-2 problema, ligado al adaptador 2R	-	1.5
Buffer de hibridación 4X	1.0	1.0
Volumen final	4	4



3.6.2 Primera hibridación

En el siguiente procedimiento, un exceso de ADNc control se añadió a cada ADNc problema (a los cuales se ligaron los adaptadores) y las muestras se desnaturalizaron por calor para permitir su alineamiento o hibridación.

1. Para cada sustracción experimental, se combinaron los reactivos que se muestran en la tabla 7.
2. Se centrifugaron los tubos y se incubaron a 98°C por 1.5 min.
3. Se incubaron los tubos nuevamente, para llevar a cabo la primera hibridación a 68°C por 8 hr y se procedió inmediatamente con la segunda hibridación.

Nota: Las muestras se pueden hibridar desde 6 hr hasta 12 hr. No se debe dejar la incubación por más de 12 hr.

3.6.3 Segunda hibridación

Los 2 tubos de la primera hibridación se mezclaron y se añadió ADNc control fresco desnaturalizado, para enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente. Las nuevas moléculas híbridas consistieron en ADNs complementarios expresados diferencialmente con diferentes adaptadores en sus extremos.

Importante: No se desnaturalizan las muestras de la primera hibridación.

1. Se adicionaron los siguientes reactivos en un tubo eppendorf estéril

ADNc control fresco	1 μ l
Buffer de hibridación 4X	1 μ l
Agua estéril	2 μ l

2. Se colocó 1 μ l de esta mezcla en un tubo de PCR.
3. Se incubó en el termociclador a 98°C por 1.5 min, esta incubación es para desnaturalizar el ADNc control.
4. Se mezclaron los 2 tubos de la 1ª hibridación con un exceso de ADN control desnaturalizado

5. Se centrifugó el tubo
6. Se incubó la reacción toda la noche a 68°C
7. Se adicionaron 4 μ l del buffer de dilución y se mezcló por pipeteo
8. Se incubó el tubo a 68°C por 7 min.
9. Se almacena a -20°C.

3.6.4 Amplificación por PCR

Los ADNc expresados diferencialmente son selectivamente amplificados durante las reacciones descritas en esta sección. Primeramente en el termociclador, se rellenan los espacios de los adaptadores por una incubación a 75°C, esto crea los sitios de unión para el iniciador PCR 1. En la primera amplificación, solamente los ADNc de doble cadena con diferentes adaptadores en cada uno de sus extremos son amplificados exponencialmente. En la segunda amplificación, el PCR anidado es usado para reducir fondo y enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente.

1. Se prepararon los templados para PCR:
 - a. Se tomó una alícuota de 1 μ l de cada ADNc sustraído y su correspondiente control problema no sustraído y se colocaron las muestras en tubos de PCR debidamente etiquetados.
 - b. Se tomó una alícuota de 1 μ l de control de PCR sustraído provisto en los reactivos de la técnica.
2. Se preparó una mezcla maestra que se muestra en la tabla 8, para todos los tubos de PCR y además una reacción adicional.
3. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó el tubo.
4. Se tomó una alícuota de 24 μ l de la mezcla maestra y se colocó en tubos de PCR preparados en el paso 1.
5. Se incubó la mezcla de reacción a 75°C por 5 min. Para la extensión de los adaptadores. (no se removieron las mezclas del termociclador).

Nota: en este paso se rellenan los sitios de los adaptadores y esto crea los sitios de unión para el iniciador PCR 1.



6. Inmediatamente se empezaron los ciclos de PCR.

Perkin-Elmer Gene AMP
Sistema 2400 o 9600

•94°C 25 seg

27 ciclos:

94°C 10seg

66°C 30 seg

72°C 1.5 min.

7. Se analizaron 8 μ l de cada tubo en geles de agarosa al 2%.
8. Se diluyó 3 μ l de cada mezcla de PCR en 5 μ l de agua. Este primer producto de PCR puede ser usado en procedimientos de escrutinio diferencial.
9. Se tomó una alícuota de cada producto de PCR diluido y se colocó la alícuota en un tubo apropiadamente etiquetado.
10. Se preparó la mezcla maestra, que se muestra en la tabla 9, para llevar a cabo la segunda ronda de PCR (PCR anidado).
11. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó el tubo.
12. Se adionó una alícuota de 24 μ l de la mezcla maestra en cada tubo de reacción
13. Inmediatamente se comenzaron los ciclos de PCR.

Perkin-Elmer Gene AMP
Sistema PCR 2400 o 9600

10-12 ciclos:

94°C 10seg

68°C 30seg

72°C 1.5min

14. Se analizaron 8 μ l de cada reacción en un gel de agarosa al 2%.
 15. Se almacenaron los productos de PCR a -20°C
- La mezcla de PCR esta ahora enriquecida por ADN's complementarios expresados diferencialmente. Además los transcritos que varían en abundancia de la muestra original de ARNm ahora están presentes en cantidades iguales



Tabla 8. Reactivos para la primera amplificación por PCR

Reactivos	Cantidad por reacción (μl)	Para 7 reacciones (μl)
Agua estéril	19.5	156.0
Buffer PCR 10X	2.5	20.0
Mezcla dNTP (10 mM)	0.5	4.0
iniciador 1PCR (10 μM)	1.0	8.0
Advantage ADNc polimerasa 50X	0.5	4.0
Volumen final	24.0	192.0

Tabla 9. Reactivos para la segunda amplificación por PCR.

Reactivo	Cantidad por reacción (μl)	Para 7 reacciones (μl)
Agua estéril	18.5	148.0
Buffer de PCR 10X	2.5	20.0
Iniciador anidado 1 (10 μM)	1.0	8.0
Iniciador anidado 2R (10 μM)	1.0	8.0
Mezcla dNTP's (10mM)	0.5	4.0
Advantage DNA polimerasa 50X	0.5	4.0
Volumen final	24.0	192.0



10. Se lavo la pastilla 2 veces con 500 μ l de buffer PE, en cada lavado se resuspendio la pastilla por agitación vigorosa, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se removieron las trazas de sobrenadante. Estos lavados remueven las sales.
11. Se seco la pastilla dejando al aire de 10-15 min.
12. Para eluir el ADN, se adicionaron 15 μ l de agua desionizada estéril, se resuspendió la pastilla y se incubó de acuerdo a lo siguiente:

Fragmentos de ADN \leq 4 Kb	_____	37°C por 5 min
" de ADN 4-10 Kb	_____	50°C por 5 min
" de ADN >10 Kb	_____	50°C por 10 min
13. Se centrifugó 1 min. a 13,000 rpm y cuidadosamente con una pipeta se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf limpio. El sobrenadante contiene el ADN purificado.
14. Se almaceno a -20°C.

3.8 Ligación y Transformación de los ADNc expresados diferencialmente en el vector TOPO PCR 2.1 de Invitrogen.

Los ADNs complementarios provenientes de las hibridaciones sustractivas (genes que se prenden en presencia del virus y genes que se apagan en presencia del virus), son una colección de fragmentos que es necesario separarlos; así que se procedió a seleccionar la zona de aproximadamente 500 – 600 pb de cada hibridación sustractiva, para ligarla en el vector TOPO PCR 2.1 de invitrogen y se transformó el vector recombinante en células *E. coli* químicamente competentes.

3.8.1 Ligación

Producto de PCR (ADN's complementarios de la hibridación sustractiva)	2 μ l
Solución salina	1 μ l
Agua estéril	2 μ l
Vector TOPO 2.1	1 μ l
Volumen final	6 μ l



Tiempo de ligación: 1.5 min a 23°C en el termociclador

Se colocó en baño de hielo 5 min.

3.8.2 Transformación

Producto de ligación	2 μ l
Células <i>E.coli</i> químicamente competentes	50 μ l

Se mezcló suavemente con la punta de una micropipeta el producto de ligación con las células *E.coli* en un tubo eppendorf y se incubó 5 min. en hielo, inmediatamente se procedió a la reacción de transformación por choque térmico.

4. Reacción de transformación: 45 seg a 42°C en un termoblock
5. Posteriormente el tubo de reacción se incubó 5 min. en baño de hielo, después de este periodo de incubación se adicionaron 250 μ l de medio Soc y se incubó 1h a 37°C a 250 rpm.
6. Se sembraron 50 μ l de cada transformación en cajas petri previamente preparadas con medio LB, antibiótico Kanamicina, IPTG y X-gal.
7. Se Incubó 12 h a 37°C.

La colección de colonias blancas con inserto conforman las bibliotecas sustractivas correspondientes.

3.9 Extracciones plasmídicas. Método QIAprep.

1. Se sembró en 5 ml de medio LB líquido una asada de cada colonia blanca obtenida en la transformación. Se Incubó por un periodo mínimo de 6 h y máximo de 12 h a 37°C con agitación constante.
2. Para cosechar las células, se colocaron 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugo a 13,000 rpm 5 min. Se descartó el sobrenadante. Se repitió este paso una vez más adicionando nuevamente cultivo al mismo tubo.
3. Se recuperó la pastilla adicionando 250 μ l de buffer de homogeneización P1, se agito.



4. Se adicionaron 250 μ l de buffer de lisis P2, invirtiéndose el tubo 4-6 veces. No se permitió que la lisis procediera por más de 5 min.
5. Se adicionaron 350 μ l de buffer de neutralización N, se invirtió el tubo 4-6 veces.
6. Se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm 10 min.
7. Se recuperó el sobrenadante aproximadamente 800 μ l.
8. Se precipitó el ADN plasmídico adicionando 750 μ l de isopropanol y se dejó reposar 5 min.
9. Se centrifugó a 13,000 rpm 5 min, se descartó el sobrenadante.
10. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, para eliminar sales.
11. Se centrifugó 13,000 rpm 5 min, se descartó todo residuo de etanol.
12. Se resuspendió en agua estéril desionizada o en TE.
13. Se almacena a -20°C .

Nota: Cuando se necesita el ADN plasmídico de alta pureza, en lugar de precipitar con isopropanol, se procede como se indica a continuación:

1. Se aplicó el sobrenadante en la columna para purificación de ADN plasmídico y se centrifugó a 13,000 rpm 1 min, se descartó el filtrado.
2. Se lavó la columna adicionando 750 μ l de buffer PE, se centrifugó a 13,000 rpm 1 min, se descartó el filtrado.
3. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf, se centrifugó 13,000 rpm 1 min, Esta centrifugación extra es para remover el buffer PE residual, residuos de etanol de éste buffer pueden inhibir enzimas en pasos posteriores.
4. Se colocó la columna en un tubo limpio, se dejó incubando 1 min a temperatura ambiente y se eluyó el ADN plasmídico adicionando 50 μ l de agua desionizada estéril, se centrifugó a 13,000 rpm 1 min.
5. Se almacena a -20°C .



3.10 Construcción de arreglos de ADNc.

Para construir los arreglos se utilizaron membranas de nylon marca Hybond-N⁺ de la compañía amersham pharmacia biotech.

De las extracciones plasmídicas de las bibliotecas sustractivas, se hicieron PCRs utilizando los iniciadores anidados, con éstos productos de PCR se construyeron los arreglos. Esto se hizo con la finalidad de eliminar interferencia del vector al hibridar los arreglos con sus respectivas sondas.

Los arreglos constaron de 5.2 x 5.2 cm de membrana y la separación entre cada punto fue de 0.5 cm.

Se hicieron diluciones para tener las concentraciones de los productos de PCR a concentraciones similares (50ng/ μ l). Se llevaron a un volumen final de 10 μ l y se desnaturalizaron las muestras por 5 min en agua hirviendo y se procedió a colocar 2 μ l de cada muestra en la membrana.

Se construyeron 2 arreglos, para hibridar uno con la sonda marcada de ADNc proveniente de las plantas infectadas y el otro se hibridó con el ADNc proveniente de la planta control (sin virus), además cada arreglo estuvo formado por 45 ADNc diferenciales de genes que se encienden por presencia del virus y 38 ADNc diferenciales provenientes de genes que se apagan por presencia del virus.

3.11 Etiquetado de sondas y amplificación de la señal. Método ECF de amersham pharmacia biotech

Para hibridar los arreglos, se utilizaron como sondas, el ADNc amplificado sin purificar de la condición problema (proveniente del ARNm de las plantas infectadas con el virus) y el ADNc amplificado sin purificar de la condición control (proveniente del ARNm de las plantas sin virus).



El método ECF es un sistema de etiquetado de sondas al azar y amplificación de señales, permite la producción de sondas de ADN marcadas con fluoresceína debido a la presencia de fluorescein-11-DUTP. Lavados de hibridación y astringencia de los arreglos de ADNc, permiten una alta selectividad de hibridación y pueden ser detectados directamente en instrumentos como fotodocumentadores. La amplificación de señales es posible por el uso de un conjugado de fosfatasa alcalina antifluoresceína (AP). Después de lavados para quitar el exceso de conjugado, la unión sonda-AP es usado para catalizar la conversión del agente de detección a un producto altamente fluorescente.

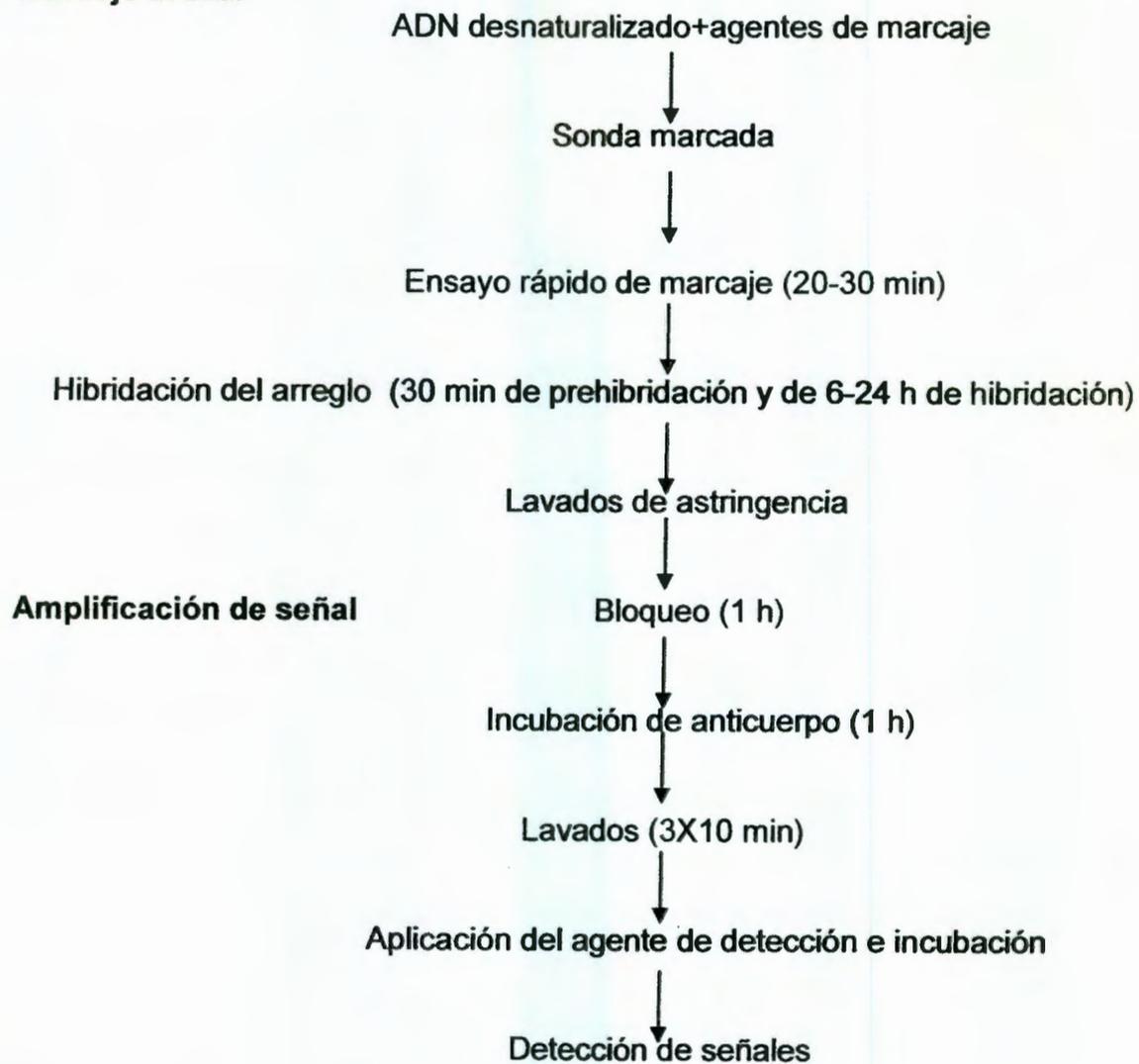
Marcaje al azar

Figura 10. Diagrama de hibridación y detección de señal. Método ECF.



El sistema de hibridación y detección de señal está diseñado como se indica en la figura 10.

1. Se llevó a un volumen de 10 μl el ADN (25 ng - 2 μg) que va a ser marcado.
2. Se desnaturalizó la muestra de ADN colocándola en baño maría por un periodo de 5 min e inmediatamente se pasó a un baño de hielo.
3. En un tubo eppendorf, colocado en baño de hielo, se adicionaron los siguientes reactivos:

Mezcla de nucleótidos	10 μl
Iniciadores	5 μl
ADN desnaturalizado	10 μl
Enzima Klenow (5 U/ μl)	1 μl
Agua	24 μl
Volumen final	50 μl

4. Se mezcló por pipeteo de arriba abajo, se tapó el tubo y se centrifugó para coleccionar los reactivos en el fondo del tubo. Se evitó pipetear vigorosamente ya que puede perderse la actividad de la enzima.
5. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C 1h
6. Se adicionaron 2 μl de EDTA 0.5 M para terminar la reacción. Las sondas marcadas pueden almacenarse a -20°C por un periodo de 6 meses.

3.11.1 Monitoreo de la sonda marcada.

1. En una membrana de nylon se colocaron 5 μl de la sonda marcada y 5 μl de una dilución 1:5 de mezcla de nucleótidos.
2. Se colocó la membrana en un recipiente adecuado y se lavó con agitación durante 15 min a 60°C en un exceso de SSC 2X precalentado.
3. Se observó la membrana en un transiluminador UV usando una λ 254 nm o fotodocumentador. La sonda marcada debe observarse como una gota intensamente fluorescente, lo cual indica que a la sonda fue exitosamente incorporada la fluoresceína.



3.11.2 Hibridación y lavados de astringencia.

1. El buffer de hibridación esta compuesto por:

SSC 5X

SDS 0.1%

Líquido de bloqueo 1/20

Sulfato dextran 5%

Se mezclaron todos los componentes.

2. Se precalentó el volumen requerido del buffer de hibridación (0.3 ml/cm² de membrana) a 65°C, se colocó el arreglo en el buffer y se prehibridó por al menos 30 min a 65°C con agitación constante. Las hibridaciones se llevaron a cabo en un horno hibridador modelo 136400.
3. En un tubo eppendorf se colocaron 5 µl de la sonda marcada y 5 µl de agua, la sonda se desnaturizó en baño maría por 5 min e inmediatamente se colocó en un baño de hielo y se centrifugó la sonda desnaturizada, entonces se adicionó al buffer de prehibridación, evitando colocarlo directamente en la membrana y se dejó agitando.
4. Se hibridó 12 h a 65°C con agitación suave.
5. Se preparó la solución para el lavado de astringencia, SSC 1X y SDS 0.1%, se precalentó a 65°C. Cuidadosamente se colocó la membrana en esta solución y se lavó por 20 min a 65°C con agitación. Posteriormente se lavó en una solución precalentada a 65°C de SSC 0.5X, SDS 0.1% por un periodo de 20 min. Ambas soluciones deben ser usadas en un volumen de aproximadamente 2-5 ml/cm² de membrana.

3.11.3 Bloqueo, incubación de anticuerpo y lavados.

1. Se colocó la membrana en un exceso de Buffer A (2 ml/cm²) a temperatura ambiente.
2. Se incubó 1 h a 37°C los arreglos en una solución 1:10 de líquido de bloqueo y buffer A.
3. Se enjuagó la membrana en buffer A.



4. Se diluyó el conjugado de antifuoresceina AP 5000 veces en 0.5% de suero bovino en buffer A. Se incubaron las membranas en el conjugado diluido (0.3 ml/cm² de membrana) con agitación durante 1h.
5. Se removió el conjugado no unido con 3 lavados de 10 min de Tween 20 al 0.3% en buffer A a temperatura ambiente con agitación (2-5 ml/cm²)
6. Se enjuagaron los arreglos en buffer A.

3.11.4 Generación y detección de la señal.

Después de la incubación con el anti-cuerpo y los lavados, se drenó el exceso de buffer A. Se aplicó con una pipeta el agente de detección al arreglo en una proporción 2.5 μ l/cm², el agente de detección se adciono lentamente sobre la membrana sin tocarla. Los arreglos se colocaron en bolsas de plástico proporcionadas por el paquete y la señal pudo observarse desde las 3 h siguientes, pero la señal incrementa con el tiempo, por lo que nuevamente se observo al dia siguiente utilizando luz UV.



IV. RESULTADOS

4.1 Biobalística.

Se inocularon 10 plantas con el virus PHV (plantas problema) y 6 plantas con el plasmido BlueScript (Sk+) (plantas control); las plantas se almacenaron en una incubadora con temperatura de 30°C +/- 2°C y con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

4.2 Extracción de ADN genómico.

A los 15 días posinoculación se observaron síntomas característicos de infección por PHV en las plantas problema, mientras que en las plantas control no se observó ningún síntoma de infección, ver figura 11. Se procedió a extraer ADN genómico de las plantas, ver figura 12, para posteriormente detectar el virus en las plantas problema por PCR.



Figura 11. a) Planta infectada con virus b) Planta sin virus



Figura 12. Extracción de ADN genómico de plantas de chile. Carriles 1-2: ADN de planta sin virus (control); Carriles 3-4: ADN de planta con virus (problema).



4.3 Detección del PHV

La detección del virus en las plantas problema, además de observar físicamente los síntomas característicos por infección con PHV, también se realizó detección del virus mediante la técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos para PHV denominados 240 y 241, estos amplifican un fragmento de 350 pb que corresponde a la región intergénica del componente A. También se analizaron las plantas control. En la figura 13, se muestra que en plantas problema se observó la amplificación del tamaño esperado, mientras que en los controles no se observó este fragmento. Así, con estas plantas en las que se comprobó la presencia del PHV, se prosiguió con el estudio

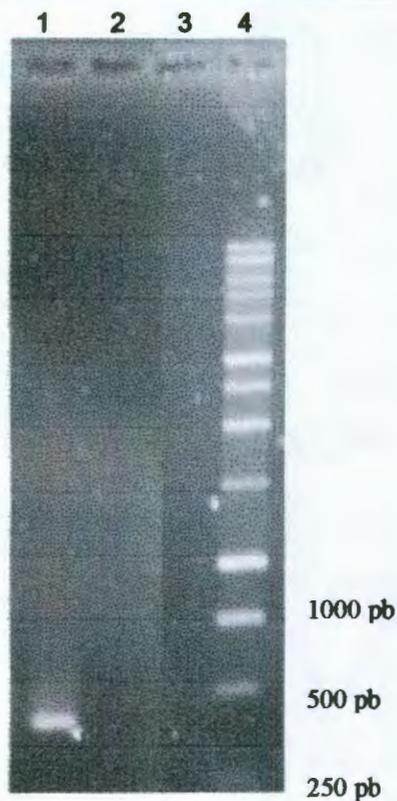


Figura 13. Detección de PHV en planta problema y plantas control. Carril 1: Planta con virus, fragmento amplificado a 350 pb aproximadamente; Carriles 2-3: Plantas sin virus no amplificación del fragmento; Carril 4: 1Kpb Marcador de tamaño molecular.

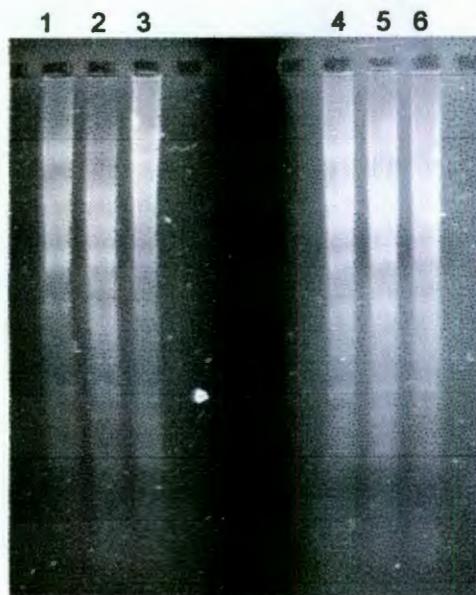


Figura 14. Extracción de ARN de plantas de Chile. Carriles 1-3: Planta con PHV; Carriles 4-6: Planta sin PHV.



respecto al óptimo (subciclado), resulta un bajo rendimiento de los productos de PCR.

Enfocándonos en la figura 15, compararemos 21 ciclos que fue el número de ciclos óptimo, en donde se encontraron mejor representados los ADNc, es decir en este número de ciclos se tiene una mejor definición de bandas por lo que existe mayor representación de los mensajes. Cuando hay un sobreciclado, se alcanza la zona de meseta de la amplificación, la producción de ADNc para de incrementarse y ocasiona un barrido en la región de alto tamaño molecular como se observa a 24 ciclos, en la figura 15. Tampoco es recomendable un subciclado ya que resulta una concentración pobre de ADNc, tal es el caso a los 15, 17 y 19 ciclos. Como se menciona en nuestro trabajo, 21 ciclos resulto el óptimo para la amplificación exponencial de los ADNc. Además se comparan los ADNc de la condición problema y condición control, contra un control interno que suministra el protocolo, tal es el caso del ADNc de placenta de humano, el cual también nos es de mucha utilidad para seleccionar el ciclo óptimo de amplificación.

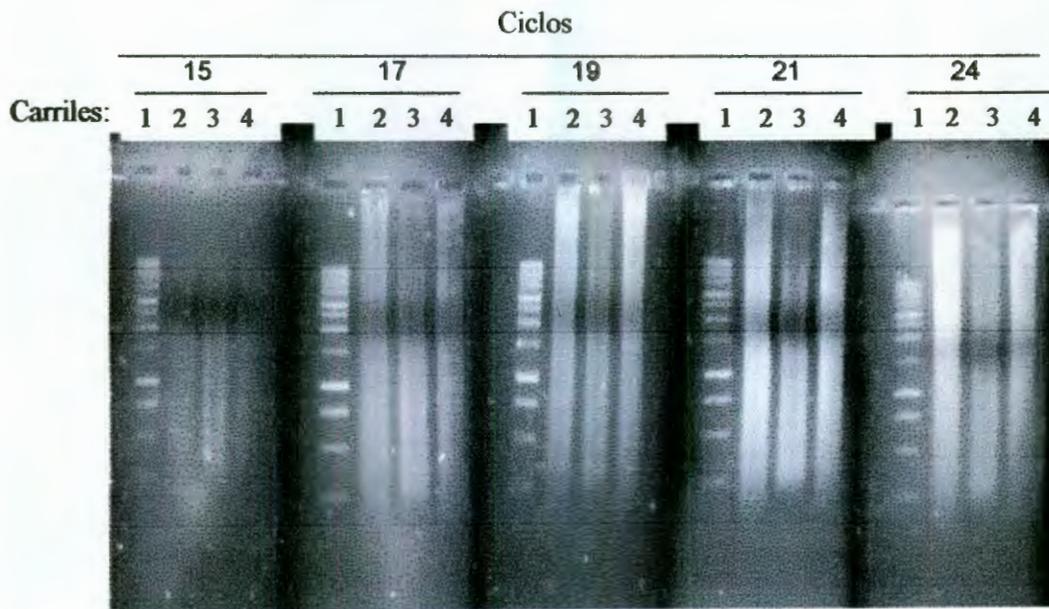


Figura 15. Optimización de los ciclos de PCR para la amplificación de los ADNc.
Carril 1: 1Kpb Marcador de tamaño molecular; Carril 2: Control, ADNc de placenta;
Carril 3: ADNc de planta sin virus; Carril 4: ADNc de planta con virus.

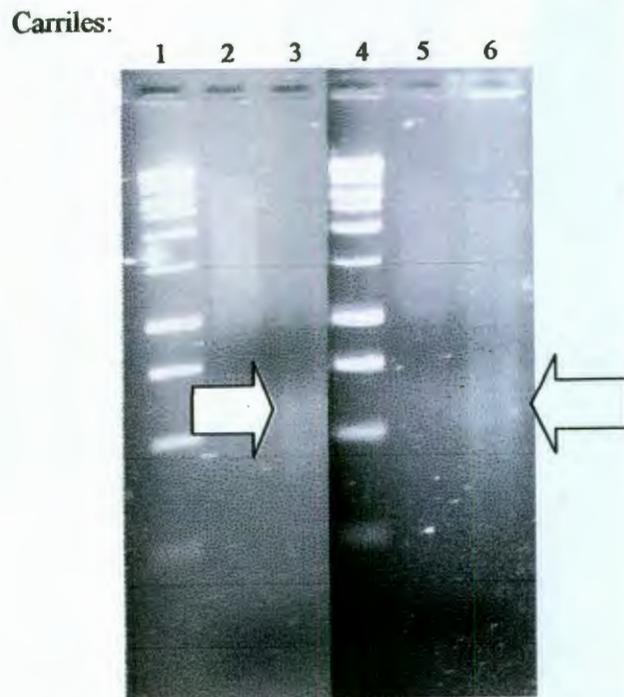


Figura 16. Digestión con la enzima de restricción *Rsa* I. Carril 1 y 4: 1Kpb marcador de tamaño molecular; Carril 2: condición-planta con virus sin digerir; Carril 3: condición-planta con virus digerido; Carril 5: condición-planta sin virus sin digerir; Carril 6: condición-planta sin virus digerido. La flecha indica que después de la digestión se enriquece la zona indicada.



Una vez amplificado el ADNc de la condición con virus y condición sin virus, se purifica mediante extracciones fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y por columna cromatográfica (suministrada en el protocolo) para eliminar impurezas.

Tanto la población de ADNc de planta sin virus como de la condición de planta con virus se digieren con la enzima *Rsa I*, la cual reconoce cuatro pares de bases, de tal manera que cada ADNc queda dividido en múltiples fragmentos (~600pb). Esta digestión ofrece 2 importantes ventajas:

1. Fragmentos largos de ADNc forman complejos, lo cual no permite la formación de híbridos requeridos para una eficiente hibridación sustractiva.
2. Los ADNc cortados en pequeños fragmentos proveen una mejor representación de genes individuales.

Podemos observar en la figura 16 que una vez digerida la población de ADNc de la condición de planta con virus y de planta sin virus se observa más enriquecida (barrido) en la zona de 500 - 1000 pb comparando con el barrido antes de la digestión.

4.6 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR (SSH)

Los fragmentos de ADNc obtenidos en la técnica anterior fueron sujetos a purificación y posteriormente a hibridación sustractiva, obteniéndose fragmentos de genes expresados diferencialmente, suprimiendo simultáneamente los fragmentos constitutivos; es decir aquellos que están presentes tanto en la ausencia como presencia del virus en la planta. La digestión con la enzima *Rsa I* de los fragmentos de ADNc, generó fragmentos de genes con extremos rasurados, los cuales son necesarios para la ligación de los adaptadores y la sustracción, se dividió en 2 alícuotas los ADNc de la condición problema y cada población se ligó con diferentes adaptadores (1 y



2R) y se llevaron a cabo las hibridaciones. En la primera hibridación las alícuotas se desnaturalizan, las poblaciones de ADNc condición problema se hibridaron por separado con la población de ADNc control. En la segunda hibridación se combinaron los productos de las primeras hibridaciones adicionando un exceso de ADN control desnaturalizado. Se llevaron a cabo dos rondas de PCR. En el primer PCR se empleo el iniciador PCR 1 para seleccionar la población generada en la segunda hibridación que tiene en sus extremos las secuencias de los adaptadores y en el segundo PCR se emplearon los iniciadores anidados para enriquecer los fragmentos diferenciales.

Es importante señalar que se hicieron 2 tipos de hibridaciones sustractivas, la diferencia se debe a que población de ADNc se ligaron los 2 tipos de adaptadores y esta población con adaptadores es considerada como población problema. Una hibridación sustractiva comprende aquellos fragmentos de genes diferenciales que se prenden por la presencia del virus PHV en la planta y se ligaron los adaptadores a la población de ADNc provenientes de las plantas con virus (población problema), a diferencia de la otra hibridación sustractiva en donde los adaptadores se ligaron a la población de ADNc proveniente de la planta sin virus (población problema), aquí se encuentran los fragmentos de genes que se apagan por presencia del virus PHV en la planta. Así que presentaremos los resultados de ambas hibridaciones sustractivas.

La figura 17 muestra un gel de agarosa al 2%, que corresponde a la hibridación sustractiva de fragmentos de genes diferenciales que se prenden por presencia del virus en la planta, podemos observar que la población (colección de bandas o fragmentos) de ADNc sustraído se encuentra enriquecida en la zona entre 250-600 pb aproximadamente, esto se debe a la digestión previa a la hibridación sustractiva. Además se corrieron varios ciclos hasta observar mejor representados la colección de fragmentos diferenciales, comparando con el control ADNc ϕ X174 digerido Hae III provisto en el paquete, en este caso el ciclo seleccionado fue a los 12.



La figura 18 corresponde a la hibridación sustractiva de fragmentos de genes que se apagan, en este caso se seleccionaron 18 ciclos. Se observa un barrido muy intenso aproximadamente entre $<250\text{pb}-250\text{ pb}$ en la población de ADNc sustraído; así que para enriquecer fragmentos diferenciales de mayor tamaño, se corto con un bisturí la zona de 400 – 500 pb, se hizo extracción de ADN de geles de agarosa con el método QIAEX II y se amplifico una vez más por PCR utilizando los iniciadores anidados.

En la figura 19, se muestra la amplificación que se hizo con los iniciadores anidados y efectivamente se enriquecieron fragmentos diferenciales de mayor tamaño, éstos van de $\leq 250 - 1200\text{ pb}$ aproximadamente.

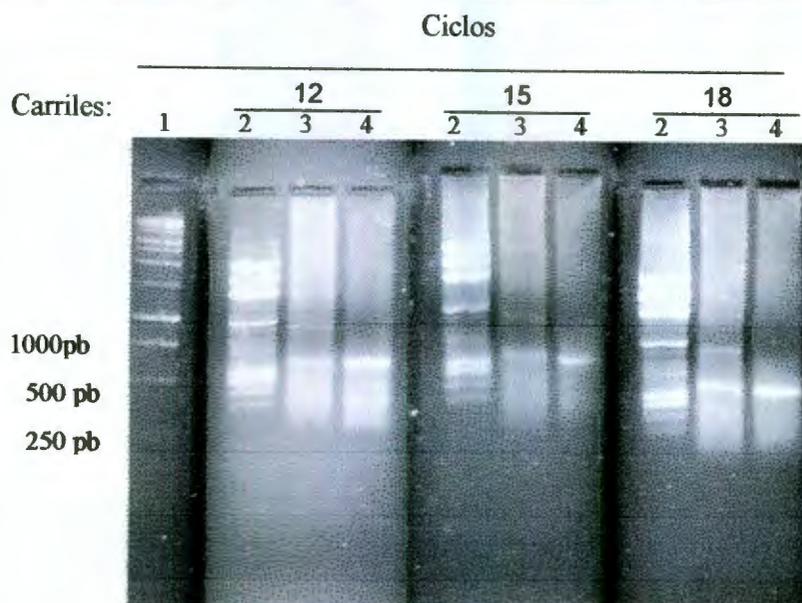


Figura 17. Hibridación sustractiva de fragmentos de genes diferenciales que se prenden por presencia del virus en la planta. Amplificación por PCR. Carril 1: 1Kpb marcador de tamaño molecular; Carril 2: control sustraído de ADNc *Hae* III-digerido ϕ X174 (provisto en el protocolo); carril 3: Población de ADNc No sustraído; Carril 4: Población de ADNc sustraído.

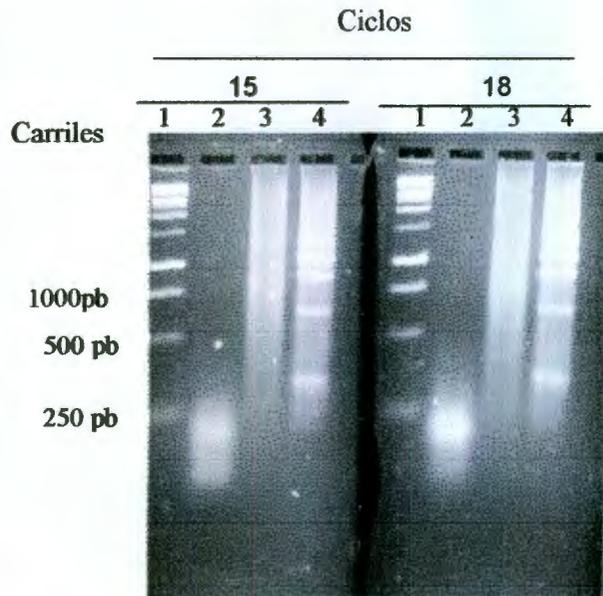


Figura 18. Hibridación sustractiva de fragmentos de genes diferenciales que se apagan por presencia del virus en la planta. Amplificación por PCR. Carril 1: 1Kpb marcador de tamaño molecular; Carril 2: Población de ADNc sustraído; Carril 3: Población de ADNc no sustraído; Carril 4: Control sustraído de ADN de ϕ X174 digerido *Hae* III (provisto en el protocolo).

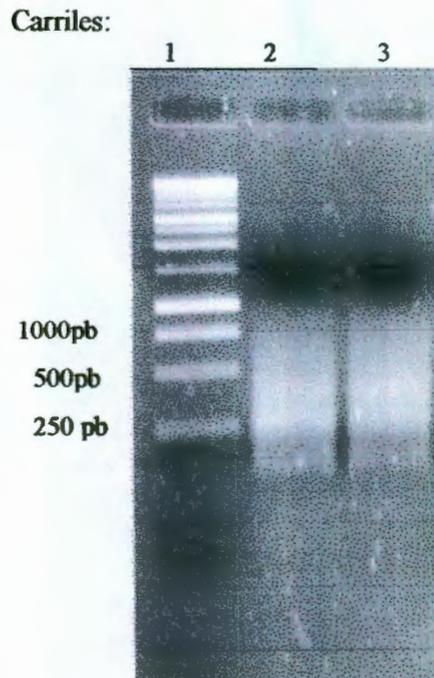


Figura 19. Amplificación con iniciadores anidados. Carril 1, 1Kpb marcador de tamaño molecular; Carriles 2-3, Amplificación por PCR con iniciadores anidados.



4.7 Construcción de bibliotecas sustractivas

Para analizar la colección de fragmentos de ADNc expresados diferencialmente, de los 2 tipos de hibridaciones sustractivas realizadas, primeramente se selecciono la zona de entre 250 -1000 pb, se corto del gel de agarosa con un bisturí para extraer el ADN por el método QIAEX II, posteriormente se procedio con la ligación en el vector TOPO PCR 2.1 y se transformaron células químicamente competentes de *E. coli*.

En la figura 20 se muestra una foto de las transformantes, es decir una colección de colonias con fenotipo color blanco y azul. Las colonias de interés que posiblemente tienen los fragmentos de ADNc diferenciales, son las blancas, pero es necesario confirmarlo. El análisis inicia con la extracción de ADN plasmídico utilizando el método QIAprep y se hicieron digestiones de cada extracción plasmidica, con la enzima de restricción *EcoR* I, (ver figura 6), esta enzima flanquea los fragmentos que fueron clonados, así que para liberarlos fue necesario hacer las digestiones.

En la figura 21 se observan fragmentos liberados debido a digestiones con la enzima *EcoR* I, como podemos observar la mayoría de las colonias blancas tienen inserto, éstas integran los bancos sustractivos los cuales estan constituidos en su mayoría por clonas con variedad de fragmentos de tamaños que van desde ≤ 250 pb hasta 500pb.

De esta manera se construyeron las 2 bibliotecas sustractivas: a) Biblioteca sustractiva donde se encuentran los fragmentos de genes expresados diferencialmente que se encienden por presencia del virus PHV en las plantas de chile, la cual consta de 61 clonas con inserto y b) biblioteca sustractiva constituida por fragmentos de genes diferenciales que se apagan por presencia del virus PHV en las plantas de chile que consta de 48 clonas con inserto. Las tablas 10 y 11 muestran los tamaños estimados de las clonas de cada biblioteca sustractiva.

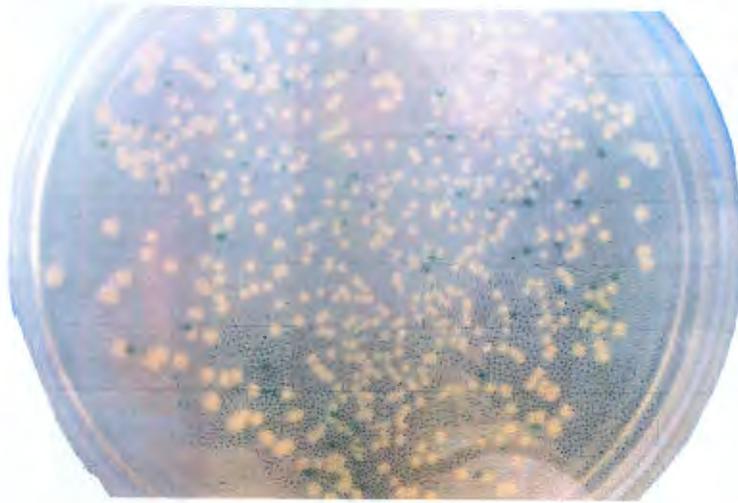


Figura 20. Transformantes.

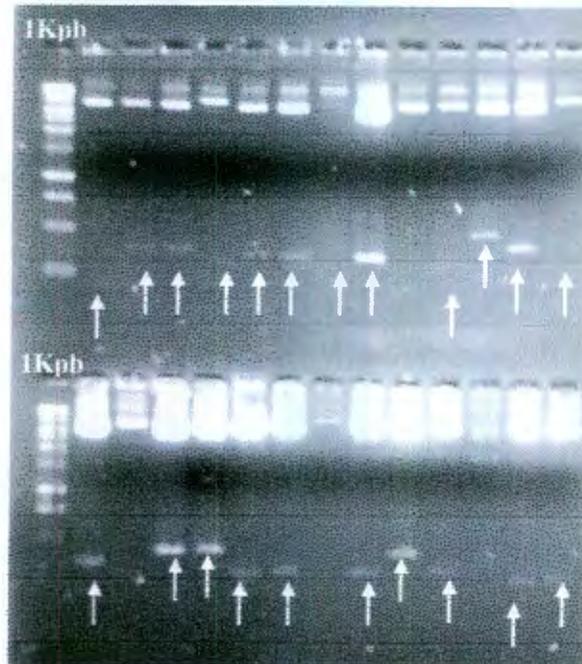


Figura 21. Gel de agarosa al 1.0%/EtBr. ADN plasmídico de colonias blancas digerido con la enzima de restricción *EcoR* I. las flechas indican los fragmentos liberados.



Tabla 10. Tamaño estimado de fragmentos de genes que se prenden por presencia del virus en la planta.

Tamaño estimado	No. de clonas
< 250pb	7
250pb	18
300pb	23
400pb	11
500pb	2

Tabla 11. Tamaño estimado de fragmentos de genes que se apagan por presencia del virus en la planta

Tamaño estimado	No. de clonas
< 250pb	10
250pb	22
300pb	11
400pb	5
500pb	0



Una vez elaboradas las bibliotecas sustractivas, se procedió a su caracterización.

4.8 Caracterización de las bibliotecas sustractivas:

4.8.1 Amplificaciones por PCR con iniciadores anidados 1 y 2R.

Los iniciadores anidados 1 y 2R se utilizaron en las hibridaciones sustractivas, cuando los ADNc diferenciales se amplificaron en la 2a ronda por PCR. Para construir los arreglos de ADNc se utilizaron los productos de PCR de los iniciadores anidados, con la finalidad de evitar posibles interferencias en la hibridación de los arreglos con el vector TOPO PCR 2.1. En la figura 22 observamos los productos de PCR de los iniciadores anidados en un gel de agarosa al 1%.

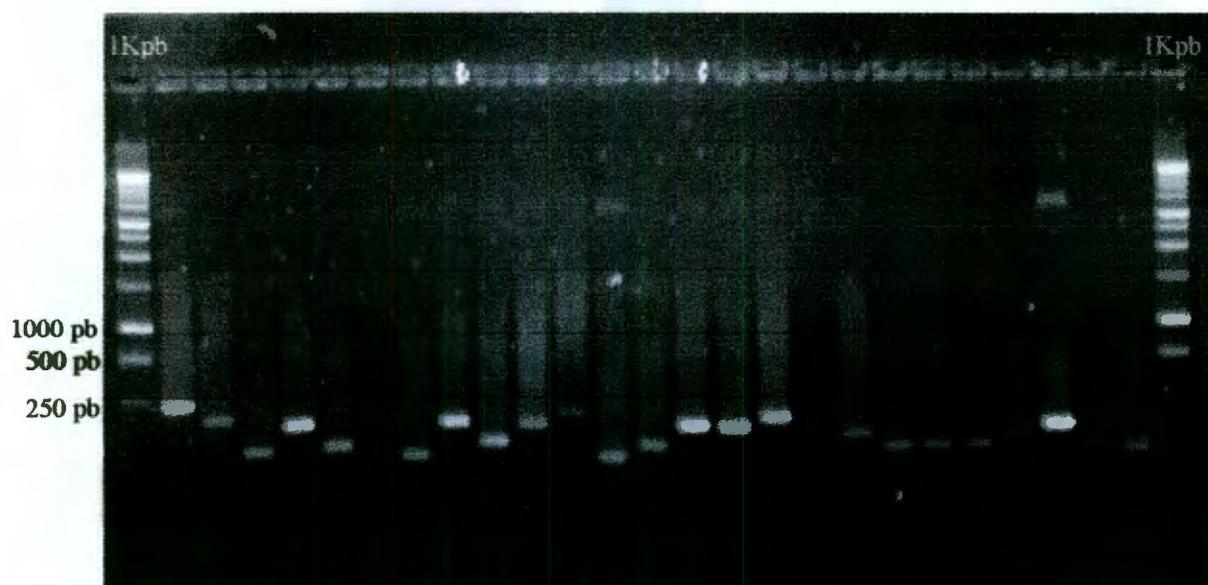


Figura 22. Gel de agarosa al 1%, PCR's utilizando iniciadores anidados para la construcción de los arreglos



4.8.2 Construcción e hibridación de los arreglos de ADN complementarios.

Los arreglos de ADN complementarios de genes diferenciales que se encienden por presencia del virus PHV en la planta de chile susceptible y de ADN complementarios de genes diferenciales que se apagan por presencia del virus en la planta de chile susceptible, fueron construidos a partir de los productos de PCR utilizando iniciadores anidados, esto se hizo con la finalidad de eliminar posibles interferencias del vector TOPO PCR 2.1 al hibridar los arreglos con las sondas.

Se hicieron varias diluciones para que los productos de PCR quedarán en concentraciones aproximadamente iguales (~50ng/μl). El volumen final se llevo a 10 μl en TE y las muestras se desnaturalizaron por calor en baño de agua hirviendo por 5 min e inmediatamente se colocaron en hielo. En la membrana de nylon se depositaron 2 μl de cada muestra y se construyeron los arreglos para hibridarlos con las sondas previamente marcadas con fluoresceína (ver figura 24). En total se colocaron 45 clonas de ADNc provenientes de la hibridación sustractiva de los genes que se prenden por la presencia del virus en la planta y 38 clonas de ADNc provenientes de la hibridación sustractiva de los genes que se apagan por presencia del virus en la planta. Como controles positivos se colocaron en la membrana, ADNc proveniente de planta con virus y ADNc de planta sin virus y como control negativo se coloco TE. También se coloco TOPO PCR 2.1 con la finalidad de observar si hibridaba con las sondas y se observó que no hubo hibridación, lo cual quiere decir que no hay interferencia con el vector; esta es una información muy importante para estudios posteriores, porque no es necesario hacer amplificaciones con los iniciadores anidados para construir los arreglos.

Para hibridar los arreglos, las sondas que se utilizaron fueron ADNc proveniente de la planta con virus marcado con fluoresceína y ADNc marcado con fluoresceína proveniente de la planta sin virus. Los arreglos fueron



hibridados con ambas sondas. En la figura 23 se muestra el marcaje de las sondas y en la figura 24 los arreglos hibridados con las sondas



Figura 23. Sondas marcadas con fluoresceína. Las sondas corresponden a ADNc de cada condición. Sonda 1: ADNc proveniente de planta con virus. Sonda 2: ADNc proveniente de planta sin virus.

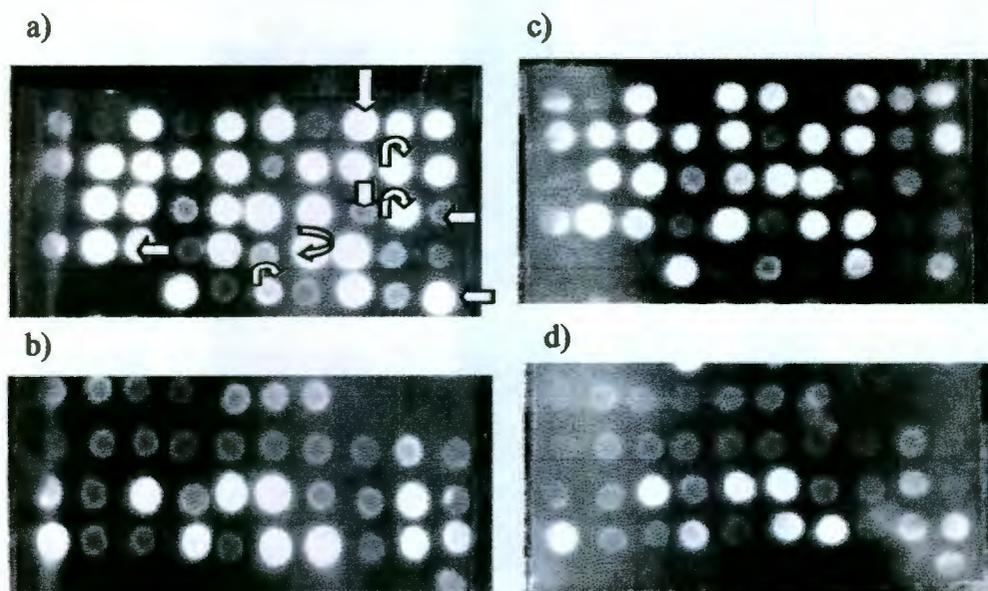


Figura 24. Arreglos de ADNc hibridados. a): Fragmentos de genes que se prenden y b): Fragmentos de genes que se apagan, ambos hibridados con sonda de ADNc de planta con virus. c): Fragmentos de genes que se prenden y d): Fragmentos de genes que se apagan, ambos hibridados con sonda de ADNc de planta sin virus.



En la figura 24, se muestra un resultado típico de hibridación de los arreglos de ADNc realizados, de acuerdo con las imágenes de los arreglos se identificaron aproximadamente 44 clonas como diferenciales, de las cuales 9 (indicadas con las flechas) se enviaron a secuenciar. Debido a que esta técnica permite comparar los arreglos, se eligieron algunos fragmentos que fueran evidentes en su cambio de expresión.

4.8.3 Secuenciación y análisis de las secuencias de algunas clonas

La comparación de las secuencias fue analizada en el GenBank de la página NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), se usaron los programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Las secuencias analizadas, tienen posibles funciones involucradas en ciclo celular (precursor de quinasas, dedos de zinc), transducción de señales (proteína Shc, dedos de zinc, precursor de quinasas, regulador de proteínas G), repuesta de defensa a patógenos (quitinasas) proteínas protectoras (glutathion s transferasa).



Tabla 12. Resultados de la comparación en Genbank de los ADNc secuenciados.

CLONA	POSIBLE FUNCIÓN	IDENTIDAD	SIGNIFICANCIA
YRH 1	ARNm expresado diferencialmente en melanoma maligno	97%	2×10^{-7}
YRH 3	Dedos de Zinc homeodominio 4	100%	3×10^{-7}
YRH 4	Formato deshidrogenasa	100%	0.021
YRH 5	Proteína Shc	68%	.014
YRH 6	Quitinasa	90%	3×10^{-13}
	Regulador de proteína G	90%	4×10^{-9}
	Precursor de Quinasa	89%	4×10^{-9}
YRH 8	Glutation S transferasa	100%	3×10^{-6}



V. DISCUSION

La técnica de Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR (SSH) en combinación con arreglos de ADNc, en la actualidad han sido empleadas en el escrutinio de genes expresados diferencialmente en una variedad de organismos. En general la técnica SSH es confiable, por su sensibilidad y la cantidad de información que obtenemos, ya que nos permite analizar cientos o miles de clonas simultáneamente y por su reproducibilidad. La SSH, esta en ventaja con el despliegue diferencial por ser más sensible y eliminar aquellos genes constitutivos, además es posible detectar aún aquellos transcritos de baja abundancia y no es laboriosa al no realizarse geles de poliacrilamida (Bos y Hadman 1998; Diatchenko, 1996)

En cuanto a la extracción de ARN, se utilizó la técnica de RNeasy, en este paquete todas las moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos son aisladas, lo que provee un enriquecimiento de ARNm.

Para la síntesis de ADNc a partir de ARNm, se utilizó la técnica SMART, la cual utiliza una combinación de oligonucleótidos, (oligonucleótido dT modificado -SMART CDS 3'-, oligonucleótido SMART IIA y oligo IIA 5'), que permiten, mediante PCR enriquecer exponencialmente los ADNc sintetizados a partir de los ARNm. Además se utilizó como transcriptasa reversa, la SuperScript II, en esta enzima la actividad RNasa H esta eliminada, por lo cual se incrementa la producción de ADNc y además lee completos los ARNm, también tiene actividad terminal transferasa, que adiciona algunos nucleotidos de deoxicitidina al extremo 3' del ADNc naciente, al cual se une el oligonucleótido SMART creando un templado para la trasncripatasa reversa la cual sigue retrotranscribiendo, asegurando que el ADNc tiene completo el extremo 5' de el ARNm. (Eickoff *et al* 2001)



Los arreglos de ADNc, se construyeron manualmente, sin embargo se tiene contemplado en trabajos posteriores, realizar estos arreglos utilizando el sistema Vicky Registration System (V & P Scientific) lo que permitirá analizar simultáneamente mayor número de clonas.

Con las herramientas antes mencionadas, en este estudio se obtuvieron resultados de expresión de genes en plantas de chile *Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim infectadas con el geminivirus huasteco del chile (PHV). Los datos obtenidos del análisis de las clonas, nos indican eventos involucrados en transducción de señales y ciclo celular por la presencia del virus en la planta.

Se ha demostrado que virus de ADN, como es el caso de los geminivirus, no codifican la maquinaria de replicación viral, y por lo tanto, dependen de los factores de sus plantas hospederas, para replicar y transcribir sus genes (Gutierrez, 2000; Peele *et al.*, 2001).

En plantas la replicación de ADN y su correspondiente maquinaria esta restringida a los meristemas. Sin embargo, los geminivirus infectan células diferenciadas terminales como hojas, tallo y raíz. Estos tejidos son incapaces de replicar ADN y deben ser reprogramados para producir enzimas de replicación durante la infección por geminivirus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Se cree que la infección por geminivirus induce un estado celular en su hospedero que permite la replicación del ADN viral, por ejemplo, la fase S y regulación de algunas funciones de dicha fase (Gutierrez, 2000).

Experimentos con los geminivirus TGMV y CbLCV, demuestran que infecciones causadas por estos virus, activan genes en sus hospederos que codifican para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Investigaciones previas han demostrado que los geminivirus inducen la transcripción de PCNA (Nagar *et al.*, 1995) por unión de su proteína Rep con pRB (proteína relacionada a retinoblastoma), liberando los factores de transcripción E2F (unidos a pRB) los cuales son capaces de activar genes



requeridos para la transición G1/S y progresión de la fase S (Mittnacht, 1998). También se ha reportado que la proteína Rep presenta características muy similares al antígeno T del virus de simio SV40 y se cree que puede alterar el ciclo celular en células infectadas; entre los antígenos virales cancerígenos se encuentra el antígeno T de SV40 y este se une a la forma no fosforilada de pRB (Vega-Arreguín y Rivera Bustamante, 2001). En el análisis de nuestras clonas no se encontraron proteínas pRB o PCNA; sin embargo se hallaron homologías con factores transcripcionales como dedos de zinc, en el caso de la clona YRH 3 y proteínas Shc, clona YRH 5, la proteína Shc esta implicada en la activación de señales para Ras. Tanto Ras como pRB están involucrados en la regulación de proliferación durante la fase G1, incluso se menciona en la literatura que puede existir conexión entre Ras y pRB. Existen estudios que sugieren que pRB tiene la capacidad de regular la activación de Ras (Lee *et al.*, 1999)

La clona YRH 6, similar a un regulador de proteína G, nos hace suponer que este tipo de vías de señalamiento están involucradas en la interacción planta-virus.

Varias evidencias establecen que la proteína Rep de los geminivirus, interactúa con proteínas del huésped involucradas en división celular y desarrollo de la planta. En un estudio se utilizó la proteína Rep para escrutinio en bibliotecas de ADNc de *Arabidopsis* mediante el sistema de 2 híbridos y se encontró un fragmento que fue identificado como una cinasa, esta es una proteína nuclear abundante en células de plantas durante el desarrollo y división celular, la interacción Rep-cinasa puede estar involucrada en el establecimiento y mantenimiento de un ambiente celular favorable para la infección de geminivirus (Kong y Hanley-Bowdoin, 2002) En este estudio se encontró que la clona YRH6 tiene homología con un precursor de cinasa involucrando el ciclo celular en la infección por PHV en Chile.



La clona YRH1 de este estudio, tiene homología con un ARNm expresado diferencialmente en melanoma maligno. El haber encontrado en el análisis un fragmento relacionado con un tipo de cáncer como es el de piel (melanomas), implica proliferación celular incontrolada, es decir las células cancerosas desafían los controles normales de la división de ciclo celular, esto tiene relación con el hecho de que infecciones por geminivirus alteran el ciclo celular de las plantas infectadas.

Además en el análisis de las secuencias, nuevamente la clona YRH6 de este estudio, tiene una posible función quitinasa, las plantas codifican estas proteínas para protegerse del ataque de patógenos, en especial de hongos. Aunque no se relaciona directamente con los geminivirus, puede ser que la planta está utilizando sus mecanismos de defensa muy probablemente para combatir la infección. También se encontraron en este estudio, fragmentos como YRH 8 con posible función Glutathione S transferasa, ésta es una enzima protectora, que inactiva agentes tóxicos externos que dañan el ADN de las células, antes de que su efecto se sienta en el organismo, se sospecha que alteraciones de estas proteínas pueden desempeñar algún rol en la génesis de tumores (Corrales *et al.*, 2000).

Los resultados encontrados en este estudio, indican que el ciclo celular y rutas de transducción de señales, así como proteínas relacionadas con mecanismos de protección son expresadas en la infección de *Capsicum annuum* cv. Sonora Anaheim con PHV. Es necesario continuar con investigaciones que permitan, comprender el proceso de infección en plantas susceptibles; así como entender, el o los mecanismos en las plantas resistentes al ataque de geminivirus y en un futuro proponer estrategias de control a infecciones por geminivirus. Con un mejor conocimiento de los mecanismos de respuesta de las plantas de Chile (y quizá otras) a estos virus, deberá ayudar a la producción de Chile bajo mejores condiciones y de manera más inocua, al tratar de ayudar a disminuir la aplicación de pesticidas sobre este cultivo de gran importancia alimenticia en México.



VI. CONCLUSIONES

- 1) El número de ciclos óptimo de PCR para la amplificación de ADNc fue de 21.
- 2) Se elaboraron dos bibliotecas sustractivas: a) Biblioteca sustractiva de genes que se encienden por la presencia del virus en la planta, la cual consta de 61 clonas con inserto, b) biblioteca sustractiva de genes que se apagan por la presencia del virus en la planta, de 48 clonas con inserto.
- 3) Se encontraron 4 fragmentos de genes relacionados con ciclo celular y rutas de transducción de señales y 2 de función desconocida.
- 4) Nuestros resultados sugieren, que el geminivirus huasteco del chile (PHV), de alguna manera afecta la maquinaria celular de *Capsicum annuum* Sonora Anaheim, creando condiciones optimas para el establecimiento y mantenimiento de la infección.



VII. PERSPECTIVAS

- 1) Análisis tipo Northern, para confirmar los resultados obtenidos de la hibridación de los arreglos de ADNc.
- 2) Obtener los genes completos de los fragmentos analizados.
- 3) Estudiar todos los fragmentos diferenciales que se identificaron.
- 4) Continuar con investigaciones que permitan, comprender el proceso de infección en plantas susceptibles; así como entender, el o los mecanismos en las plantas resistentes al ataque de geminivirus y en un futuro proponer estrategias de control a infecciones por geminivirus.



VIII. REFERENCIAS

- Aiello, L., Robinson G., Lin Y.-W., Nishio Y., and King G., 1994. Identification of multiple genes in bovine retinal pericycles altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91: 6231-6235.
- Ascencio Ibañez, J.T., Monsalve Fonnegra. Z.I., Pruna Camacho, M.B., Díaz Plaza, R y Rivera Bustamante, R. F. 2000. Los Geminivirus. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17(2): 114-127.
- Argüello-Astorga, G.R., Guevara-González, R.G., Herrera-Estrella, L.R. and Rivera-Bustamante, R.F. 1994. Geminivirus Replication Origins Have a Group-Specific Organization of Iterative Elements: A Model Replication. *Virology*. 203: 90-100.
- Azzam, O., Frazer, J., De la Rosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P and Maxwell, D.P. 1994. Whitefly Transmission and Efficient ssDNA Accumulation of Bean Golden Mosaic Geminivirus Require Functional Coat Protein. *Virology*. 204: 289-296.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*. 265: 1856-1860.
- Bockelmann, R., Bonnekoh B., and Gollnick H. 1999. Optimized Visualization and PCR reamplification of differential displayed cDNA bands detected by silver staining in polyacrylamide gels as established in the model of dithranol-treated keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12(1-2): 54-63.
- Bonaldo, M de F., Lennon, G. and Soares, B. M. 1996. Normalization and Subtraction : Two Approaches to Facilitate Gene Discovery. *Genome Research*.6: 791-806.
- Bos, T., and Hadman M., 1998. Improvements to Differential Display. *BioTechniques Books* 145-157.



Collins, N.C., Webb, C.A, Ellis, J.G., Hulbert, S.H. and Pryor, A. 1998. The isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analog in Maize. *MPMI* 11(10): 968-978.

Corrales, R. M., Galarreta, D. J., Herreras, J.M., Calonge, M y chaves, F. J. 2003. Expresión de los genes de mucinas muc13, muc15, muc16 y muc17 en el epitelio conjuntival normal humano *in vivo*. *Archivos de la Sociedad Española de Oftamología*.

Dangl, J. L. 1995. Novel classes of plant disease resistance genes. *Cell*. 80: 363-366.

Desikan, R., Mackerness, S.A.H., *et al.* 2001. Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiology*. 127: 159-172.

Diatchenko L, 1996. Supression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93: 6025-6030.

Diatchenko, L., Lukyanov, S., Chris Lau, F.Y and Siebert, D.P. 1999. Suppression Subtractive Hybridization: A Versatile Method for Identifying Differentially Expressed Genes. *Methods in Enzymology*. 303: 349-381.

Duan, P.Y., Powell, A.C., Purcifull, D.E., Broglio, P. and Hiebert, E. 1997. Phenotypic Variation in Transgenic Tobacco Expressing Mutated Geminivirus Movement/Pathogenicity (BC1) Proteins. *MPMI*. 10: (9): 1065-1074.

Egelkrou, M. N., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. 2001. Proliferating Cell Nuclear Antigen Transcription Is Repressed through an E2F Consensus Element and Activated by Geminivirus Infection in Mature Leaves. *The Plant Cell*. 13: 1437-1452.

Eickhoff, B., Korn, B., *et al.* 2001. Normalization of array hibridization experiments in differential gen expresion analysis. *Nucl. Acids.Res.* 27: (22):e33.



Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathology*. 9:275-296.

Fontes, P.B., Luckow, A. V. And Hanley, B. L. 1992. A Geminivirus Replication Protein Is a Sequence-Specific DNA Binding Protein. *The Plant Cell*. 4: 597-606.

Fontes, P.B., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, T.D. and Hanley-Bowdoin.L. 1994. Geminivirus Replication Origins Have a Modular Organization. *The Plant Cell*. 6: 405-416.

Gardiner, E. W., Sunter, G., Brand, L., Elmer-Scott, J., Rogers, G. S. and Bisaro M. D. 1998. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus : the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *The EMBO journal*. 7: 899-904.

Garzón-Tiznado J.A., Torres-Pacheco I., Ascencio-Ibañes J.T., Herrera-Estrella L. and Rivera-Bustamante R. F. 1993. Inoculation of peppers with infection clones of a new geminivirus by biolistic procedure. *Phytopathology* 53 :514-521

Garzón Tiznado J.A., Acosta García G., Torres Pacheco I., González Chavira M., Rivera Bustamante R. F., Maya Hernández V., Guevara González R. G., 2002. Presencia de los Geminivirus, Huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile variante Tamaulipas (TPV-T), y Chino del Tomate (VCdT), en los Estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): 45-52

Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J. L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M and Torres-Pacheco, I. 2001. Characterization of Resistance to Pepper Huasteco Geminivirus in Chili Peppers from Yucatán, México. *Hort Science* 36(1): 139-142.

González, M. M y Boslnad, W. P. 1991. Germoplasma de *Capsicum* en las Américas. *Diversity*. 17. 57-59.



Guevara-González, R. G., Ramos, L. P., Rivera-Bustamante, F. R. 1999. Complementation of Coat Protein Mutants of Pepper Huasteco Geminivirus in Transgenic Tobacco Plants. *Phytopathology*. 89(7): 540-545.

Gutierrez C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO journal*. 19: (5): 792-799.

Gutierrez Crisanto. 2000. Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology*. 43: 763-770.

Gurskaya, G. N., Diatchenko, L., *et al.* 1996. Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase Chain Reaction : Cloning of Jurkat Cell Transcripts induced by Phytohemagglutinin and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *Analytical Biochemistry*. 240:90-97.

Hammond, K.E. and Jones J. D.G. 1997. Plant Disease Resistance Genes. *Annu. Rev. Plnt Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 575-607.

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B. M., and Robertson, D. 1999. Geminiviruses: Model for plant replication, transcription and cell regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:71-106.

Hernández Verdugo, S., Guevara González, R.G., Rivera Bustamante, R., Vazquez Yañez, C. y Oyama, K. 1998. Los parientes silvestres del chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. *Bol. Soc. Bot. México* 62:171-181.

Hernández-Verdugo, Guevara-González R.G., Rivera-Bustamante, R and Oyama K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and diffetntiatin among populations. *Euphytica* 122:31-36.

<http://www.agroenlinea.com/agro/portlets/aeconomia/aeconomicobody.jsp?ID-ANALISIS=3>



Kong, J and Hanley, B.L. 2002. A Geminivirus Replication Protein Interacts with a Protein Kinase and a Motor Protein That Display Different Expression Patterns during Plant Development and Infection. *The Plant Cell*. 14: 1817-1832.

Kyung-Soo, K and Key-Woon, L. 1992. Geminivirus-Induced Macrotubules and Their Suggested Role in Cell-to-Cell Movement. *Phytopathology*. 664-669.

Laborde, J.A., Pozo, C. O. 1984. Presente y Pasado del Chile en México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México, D.F.

Lamb, J. C. 1994. Plant Disease Resistance Genes in Signal Perception and Transduction. *Cell*. 6: 419-422.

Lazarowitz, G. S. 1992. Geminiviruses: Genome Structure and Gene Function. *Critical Review in Plant Sciences*. 11(4): 327-349.

Lee, Y. K., Ledha, H. M., McMahon, C and Ewen, E. M. 1999. The Retinoblastoma Protein is Linked to the Activation of Ras. *Molecular and Cellular Biology*. 19(11):7724.

Lenardon, S. 2003. Enfermedades endémicas y emergentes de plantas cultivadas. *Revista Ciencia hoy en línea*. 13(74).

Mahalingam, R., Gomez, B.A., *et al.* 2003. Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biology*. 4: R20.01-R20.14.

Matz, V. M and Lukyanov, A. S. 1998. Different strategies of differential display: areas of application. *Nucl. Acid. Res.* 26: (24) 5537-5543.

McDowell, J.M., Dhandaydham, M. Long, T.A., Aarts Mark, G.M. Gorr, S., Holub, E.B. and Dangl, J. L. 1998. Intragenic Recombination and Diversifying Selection Contribute to the Evolution of Downy Mildew Resistance at the *RPP8* Locus of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1861-1874.



Méndez-Lozano, J., Torres-pacheco, I., Fauquet, M.C. and Rivera-Bustamante, F. 2003. Interactions Between Geminiviruses in a Naturally Occurring Mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology*. 93(3): 270-277

Nagar, S., Bowdoin, H. L. and Robertson, D. 2002. Host DNA Replication Is Induced by Geminivirus Infection of Differentiated Plant Cells. *The Plant Cell*. 14: 2995-3007.

Nürberger, T. and Scheel, D. 2001. *Trends Plant Sci.* &:372-379

Ooi, K. and Yahara, T. 1999. Genetic variation of geminiviruses: comparison between sexual and asexual host plant populations. *Molecular Ecology*. 8: 89-97.

Pascal, E., Goodlove-Paige, E., Wu-Leeju, C and Lazarowitz S.G. 1993. Transgenic Tobacco Plants Expressing the Geminivirus BL1 Protein Exhibit Symptoms of Viral Disease. *The Plant Cell*. 5: 795-807.

Pascal, E., Sanderfoot, A., Ward, M. B., Medville, R., Turgeon, R. and Lazarowitz, S.G. 1994. The Geminivirus BR1 Movement Protein Binds Single-Stranded DNA and Localizes to the Cell Nucleus. *The Plant Cell*. 6: 995-1006.

Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L and Robertson, D. 2001. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *The Plant Journal*. 27(4): 357-366.

Pickersgill, B. 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*. 25: 683-691.

Pooma, W., Gillette, K. W., Jeffrey, J.L. and Petty, I.T. 1996. Host and Viral Factors Determine the Dispensability of Coat Protein for Bipartite Geminivirus Systemic Movement. *Virology*. 218: 264-268.

Ramos, P.L., Guevara-Gonzalez, R. G., Peral, R., Ascencio-Ibañez, J.T., Polston, J.E., Argüello-Astorga, G.R. and Rivera_bustamante, R.F. 2003. *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the



delimitation of *cis*- and *trans*- acting replication specificity determinants. Archives of Virology. 1-16.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease. 7 (4):340-347.

Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R. G., Argüello-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L. R. and Rivera-Bustamante, R. F. 1999

Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E. 1994. Systemic Acquired Resistance. Plant Physiol 104: 1109-112.

Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E., Rommens, C. M., Scofield, S. R., Kim, H. S. 1996. Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. Cell. 86: 123-133.

Sanderfoot, A. A. and Lazarowitz G. S. 1995. Cooperation in Viral Movement: The Geminivirus BL1 Movement Protein Interacts with BR1 and Redirects it from the Nucleus to the Cell Periphery. The Plant Cell. 7: 1185-1194.

Sanderfoot, A.A., Ingham, J.D and Lazarowitz G.S. 1996. A Viral Movement protein as a Nuclear Shuttle. Plant Physiol. 110. 23-33.

Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, I.L., Kim, H. S., Holstein, L. Y., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W. X., Zhu, L. H. and Ronald, P. C. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. Science. 270:1804-1806.

Sunter, G. and Bisaro, M.D. 1991. Transactivation in a Geminivirus: AL2 Gene Is needed for Coat Protein Expression. Virology 180: 416-419.

Sunter, G. and Bisaro, M. D. 1992. Transactivation of Geminivirus AR1 and BR1 Gene Expression by the Viral AL2 Gene Product Occurs at the level Transcription. The Plant Cell. 4: 1321-1331.



Tewksbury, J.J., Nabhan, P.G., *et al.* 1998. In Situ Conservation of Wild Chiles and Their Biotic Associates. *Conservation Biology*. 13(1): 98-107.

Torres Covarrubias, G., León Torres, R., Nieto Sánchez, J.A. 2000. Campaña Manejo Fitosanitario del Chile 2000. Comité estatal de sanidad vegetal de Guanajuato.

Torres-Pacheco I., Garzon-Tiznado J.A., Herrera- Estrella L., Rivera-Bustamante R.F., 1993. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J Gen Virol* 74: 2225-2231

Torres-Pacheco I., Garzon-Tiznado J.A., Brown J.K., Becerra-Flora A., Rivera-Bustamante R.F. 1996. Detection and distribution of geminivirus in México and Southern United States. *Phytopathology* 86 : 1186-1192.

Torres Pacheco, I., Guevara González, R. G., Ruíz Medrano, R. y Rivera Bustamante. 1996. Los Geminivirus como Modelos de Estudio del Ciclo Celular y de la Apoptosis en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 14(2): 88-96.

Vega Arreguín, J. C., Rivera Bustamante, R. 2001. Los virus: cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. *Avance y Perspectiva*. 20: 349-355.

Willard, M. F., Robertson, D.J. and Kent, E. V. 2000. Fundamentals of DNA Hybridization Arrays for Gene Expression Analysis. *BioTechniques*. 29(5):1042-1049.

Yang, G.P., Ross, D.T., *et al.* 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*. 27:1571-1523.

Zacatecas Gobierno del Estado. 1998-2004. Semblanza del Chile. Coordinación de promoción y seguimiento de proyectos estratégicos



APÉNDICE DE SOLUCIONES

Solución TAE 50X 1 L

242 g. Tris-base (solución amortiguador)

57.1 ml Acido acético glacial

100 ml EDTA 0.5 M pH 8.0

Se ajusta a pH 8 con el acido acético glacial.

Solución acarreadora (ioniza el ADN)

98 ml Agua destilada

2 ml TAE 50X

Regulador de extracción de ADN

Tris-HCl 100 mM

NaCl 20 mM

EDTA pH 8.0 20 mM

N-laurilsarcosina 1%

Etanol al 70%

Para 400 ml

280 ml Alcohol etílico

120 ml Agua destilada

Acetato de Sodio 3M

Para 30 ml

12.24 g. NaOac

30 ml Agua con DEPC

Solución de etanol con DEPC para tratar puntas, tubos, cámaras, morteros y demás material para extracción de ARN

998 ml Etanol

2 ml DEPC (dietil pirocarbonato, inhibidor de nucleasas)



Sumergir el material en esta solución media hora mínimo y enseguida esterilizar para eliminar restos de dietil pirocarbonato.

Agua con DEPC

999 ml Agua destilada estéril

1 ml DEPC

Esta solución al igual que la anterior se deben dejar en agitación toda la noche para lograr disolver el DEPC.

Solución desnaturalizante (separa los diferentes tipos de ARN)

4 μ L MOPS 10X

7 μ L Formaldehído 37 %

20 μ L Formamida

Combinar 25 μ g de ARN aprox. Con la mezcla desnaturalizante.

Desnaturalizar a 55 C por 15 min.

Enseguida poner en hielo por 2 minutos

Centrifugar 1 pulso a 12,000 rpm.

Gel de Agarosa desnaturalizante

Para 80 ml

0.96 g. Agarosa

8 ml MOPS

2.4 ml Formaldehído 37 %

69.6 ml Agua destilada estéril con DEPC

Fundir agarosa con el agua con DEPC.

Enfriar hasta aprox. 40 C.

Agregar MOPS 10X

Agregar Formaldehído

Agregar 1.5 μ L de bromuro de etidio.

Nota: El buffer de corrida MOPS 1X es para gel desnaturalizante.



MOPS 1X: ocupar MOPS 10X y diluir en agua tratada con DEPC hasta alcanzar la concentración 1X.

Regulador de carga para ADN

6X (Para 10 mL)

0.25% Azul de Bromofenol

0.25% Xilen-cianol

30% Glicerol en agua

Medios de cultivo

Caldo LB (1000 mL)

Bacto triptona ó peptona de caseína 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl (grado reactivo) 10 g

Disolver en 950 ml de agua destilada, aforar a 1000 ml y ajustar el pH a 7.0, esterilizar a 15 lb/plg² durante 15 minutos

Agar LB (1000 mL)

Bacto triptona ó peptona de caseína 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl (grado reactivo) 10 g

Agar 15 g

Disolver en 950 ml de agua destilada, aforar a 1000 mL y ajustar el pH a 7.0, esterilizar a 15 lb/plg² durante 15 minutos

Antibiótico 5 mL (Almacenado a una concentración final de 50 mg/mL)

Kanamicina 0.25 g

Agua destilada estéril 5 mL

Esterilizar empleando una membrana micropore de 0.22 μ m



Electroforésis en geles de agarosa al 1 %

Agarosa	1 g
TAE 50X	2 ml
Agua destilada	97 ml

Electroforésis en geles de agarosa al 1.2 %

Agarosa	1.2 g
TAE 50X	2 ml
Agua destilada	97 ml

Electroforésis en geles de agarosa al 2 %

Agarosa	2 g
TAE 50X	2 ml
Agua destilada	97 ml



Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico

(25: 24: 1)

Regulador TE

(Tris pH 7.6 10 mM, EDTA 1mM)

Regulador TNE 1X

(Tris HCl pH 8 10 mM, NaCl 10 mM, 0.1 mM EDTA)

Reactivos: Agarosa (GibcoBRL), TAE 50X, Bromuro de Etidio (GibcoBRL),

Regulador de Corrida, Regulador de carga, Marcador de tamaño molecular

(Promega, No. G5711, tamaño: 10 Kpb y para ADN de doble cadena) y agua

destilada estéril.

Stock de IPTG (10 mL)

Almacenado a una concentración final de 100 mM

IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) 238 mg

Agua estéril (dd) 10 mL

Esterilizar empleando filtración y almacenar en alícuotas de 1 ml a -20°C .

Stock de X-gal (10 mL)

X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa) 400 mg

N,N'-dimetil-formamida 10 mL

Disolver perfectamente X-gal en dimetil-formamida y almacenar en frasco ámbar a -20°C

Stock de RNasa (1 ml)

Almacenar a una concentración final de 1 mg/mL



Solución de resuspensión P1

RNasa	100 µg/mL
Tris-HCL pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM

Solución de lisis P2

SDS	200 mM
NaOH	1.0 % (w/v)

Solución de neutralización N3

Acetato de sodio	3.0 M
------------------	-------

Solución de lavado PE

Etanol	70 %
--------	------

MOPS 10X (1000 mL)

MOPS

Acetato de sodio 3M

EDTA 0.5 M pH 8.0

Disolver el MOPS en 800 mL de agua (dd) con DEPC. Ajustar al pH a 7.0 (Agregar 16 mL de NaOH 4N) y agregar el acetato de sodio. Ajustar a 1000 mL con agua. Filtrar solución.

Stock SSC 20X (1000 mL)

Cloruro de sodio 173.5 g

Citrato de sodio 88.2 g

Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 10 N. Aforar a 1000 mL y esterilizar a 15 lb/in² durante 15 min.

Stock SDS 20 % (200 mL)

Dodecil sulfato de sodio (SDS, grado electroforético) 40 g

Disolver en 170 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico.



Stock EDTA 0.5 M (500 mL)

Ácido etilen-diamino tetra-acético

Disolver en 450 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH

10 N. Aforar a 500 ml y esterilizar a 15 lb/in² durante 15 min.

Regulador A (1 X)

Tris – HCl 100 mM

NaCl 300 mM, pH 7.05

Solución de lavado 1

SSC 1 X

SDS 0.1 % (w/v)

Solución de Pre-hibridación e hibridación

SSC 2 X

SDS 0.1 % (w/v)

Líquido de bloqueó dilución 1:20

Sulfato dextrano 5 % (w/v)

Solución de lavado 2

SSC 1 X

SDS 0.1 % (w/v)

Regulador de bloqueo

Regulador A 30 mL

Líquido de bloqueó Dilución 1:10

Regulador con anticuerpo

Regulador A

Albúmina de suero bovino 0.5 % (w/v)

Antifluoresceína conjugada Dilución 1:5000



Regulador de lavado

Regulador A

200 mL

Tween 20

0.3% (v/v)